Beiträge

zur

Kenntnis der Cholesterine

und ihrer

quantitativen Bestimmung in den Fetten.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOCTORWÜRDE

VON DER PHILOSOPHISCHEN FACULTÄT

DER

FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT ZU BERLIN

GENEHMIGT

UND

NEBST DEN BEIGEFÜGTEN THESEN

ÖFFENTLICH ZU VERTEIDIGEN

am 22. September 1892

VON

Kuno Obermüller

aus Stuttgart.

OPPONENTEN:

Hr. Dr. phil. G. Döllner.
- Hütteningenieur Eckhard.
- Dr. phil. et med. P. Hagemann.

BERLIN.

Buchdruckerei von Gustav Schade (Otto Francke).

Linienstr. 158.

Seiner teuern Mutter

in Dankbarkeit

gewidmet

vom

Verfasser.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535703_0110

Im gesamten Tier- und Pflanzenreich begegnen wir einer gewissen Gruppe von Körpern, welche manches mit den Alkoholen gemein haben und durch scharfe Reaktionen, sowohl chemische wie physikalische, ausgezeichnet sind. Zuerst in der Galle aufgefunden, führen sie den Namen Cholesterine. Spätere Untersuchungen zahlreicher Forscher haben dann gezeigt, dass diese Verbindungen zu den primären Bestandteilen der Zellen des Tier- und Pflanzenkörpers gerechnet werden müssen, an deren Lebensprozessen sie teilnehmen. Demgemäss zeigen sie die weiteste Verbreitung durch alle Gewebe.

Im Jahre 1775 wiesen zuerst Conradi[1]) und 1788 Gren[2]) auf einen Körper hin, welchen sie aus den Gallensteinen erhielten. Äusserlich den Fetten ähnlich, war er jedoch in seinem chemischen Verhalten vollständig verschieden von denselben.

Später finden wir Chevreul[3]) und Berthelot[4]) mit der Untersuchung dieses Körpers beschäftigt; sie zuerst erkennen in ihm eine eigentümliche Verbindung.

In der neuesten Zeit waren es Hoppe-Seyler, Liebreich, Marcet und Schulze, welche die allgemeine Verbreitung des Cholesterins zunächst im tierischen Organismus durch ausführliche Arbeiten darlegten.

Nach Hoppe-Seyler findet sich dasselbe in den roten Blutkörperchen bis zu 0,05 %, im Serum bis zu 0,02 %, ferner in der Milch[5]), im Eigelb bis zu 0,4 %[6]), im Peruguano[7]), nach Marcet im Gehirn und

---

[1]) Inauguraldissertation, Jena 1775.

[2]) Graham-Otto, Handbuch der organ. Chemie, Bd. III.

[3]) Ann. chim. phys. [1] *95*, 5.

[4]) Beilstein, Handbuch der organ. Chemie, 1888 II, 678.

[5]) Handbuch der physiolog. Chemie p. 224.

[6]) Graham-Otto, Handbuch der organ. Chemie, Bd. III.

[7]) Journ. f. prakt. Chemie 1863, 654.

in der Galle, sowie in der Milz[8]). Walitzky constatierte, dass einem Pfund Gehirn ungefähr 2 g Cholesterin entsprechen[9]).

Im Jahre 1868 wiesen Liebermann[10]) und Friedrich Hartmann nach, dass in der als Wollfett oder Wollschweiss bekannten Substanz Cholesterin enthalten sei. Schulze erkannte es als wesentlichen Bestandteil dieses Produktes und entdeckte darin noch einen zweiten Körper von nahestehender Molekulargrösse und ähnlichen chemischen Eigenschaften, den er Isocholesterin nannte.

Liebreich, der sich mit dem Vorkommen der „Cholesterinfette" im tierischen Organismus schon seit längerer Zeit eingehend beschäftigt hatte, machte 1885 bezüglich dieser bisher nur wenig beachteten Körper eine Reihe höchst bemerkenswerter Beobachtungen bekannt. Es gelang ihm, Cholesterinfette in den verschiedensten Keratingeweben nachzuweisen, so in der menschlichen Haut, dem menschlichen Haare, im Fischbein, in den Schnäbeln und Federn von Gänsen, Hühnern, Tauben, in Pferdehufen und dergleichen.

Zum Nachweis von Cholesterin wurden diese Organe mit Chloroform extrahiert, und der nach dem Verdunsten dieses Lösungsmittels hinterbleibende Rückstand mittels der Liebermannschen Cholestolreaktion[11]) auf Cholesterin geprüft (cf. weiter unten).

Über das Vorkommen des Cholesterins resp. seiner Verwandten im Pflanzenkörper haben in erster Linie die Untersuchungen von Benecke[12]) näheren Aufschluss gegeben. Benecke stellte fest, dass die Pflanzensamen und Keimlinge, so Erbsen, Bohnen, Linsen, Mandeln, Cholesterin enthalten. —

Im Tier- und Pflanzenreich sind es nun überwiegend die Fette, und zwar die festen sowohl wie die flüssigen, welche die Cholesterine und speziell das in der Galle sich vorfindende Cholesterin in kleinern und grössern Mengen enthalten. Es giebt fast kein Fett, in welchem nicht Cholesterin aufzufinden wäre. Ob dasselbe frei oder gebunden, wie z. B. im Wollfett als Fettsäure-Cholesterylester (worauf ich später beim Isocholesterin näher eingehen werde), ist schwierig festzustellen; immerhin dürfen wir beide Möglichkeiten gelten lassen; frei vor-

[8]) Marcet, J. 1860, 592.

[9]) Walitzky, J. d. russ. phys.-chem. Ges. 8, 235.

[10]) Ber. d. d. chem. Ges. 5, 1075; 6, 251.

[11]) Ber. 18, 1804.

[12]) Ann. Chem. Pharm. 1862, *122*, 249.

kommend in gelöstem Zustande finden wir es nur in der Galle, wo es durch Vermittelung der zugleich anwesenden Seifen in Lösung gehalten wird. Pathologisch bildet es auch in der Gallenblase oder in den Gallengängen Concretionen, die man als Gallensteine bezeichnet; diese liefern auch meistens das Rohmaterial zur Darstellung des reinen Cholesterins[13]), da namentlich die hell gefärbten 60 bis 90% dieses Stoffes enthalten. Zuweilen stellt man es jedoch auch aus Gehirnmasse dar. Wenn man letztere mit Alkohol und Äther auszieht und das Lösungsmittel verdunstet, so bleibt Cholesterin in locker krystallisierter Form zurück und nimmt in diesem Zustande oft ein grösseres Volumen ein als das angewandte Gehirn selbst.

Dieses Cholesterin der Galle und des Gehirns ist am längsten bekannt und am meisten untersucht; es bildet grosse, perlmutterglänzende Krystallblätter, monokline Tafeln oder Nadeln, je nachdem es aus Alkohol, Alkoholäther oder Eisessig auskrystallisiert ist. Sein Schmelzpunkt liegt nach Gobley, Hesse[14]) bei 145°, die Krystalle fühlen sich fettig an und enthalten eine Molekel Krystallwasser, welche sich schon bei 100° abtrennt. Das spezifische Gewicht des Cholesterins beträgt nach Hoppe-Seyler[15]) 1,067. Für gelbes Licht beträgt sein Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -34°$, für rotes Licht $-27°$ (bei 15°, 2 g in 100 cc Äther gelöst). Es ist also linksdrehend; diese Ablenkung wird weder durch Erhitzen noch durch Stehenlassen verändert[16]). In Wasser ist es unlöslich, in kaltem Alkohol schwerlöslich, leicht dagegen in Äther (1 : 3,7) und in kochendem Alkohol (1 : 9), sowie in Chloroform (1 : 6,6). Diese Lösungsverhältnisse stellte Chevreul fest, welcher auch den Siedepunkt des Cholesterins zu 350° bestimmte. Es geht unter Luftabschluss fast unzersetzt bei dieser Temperatur über; nur geringe Mengen zersetzen sich zu öligen Produkten, die hauptsächlich aus hochsiedenden Kohlenwasserstoffen von der Zusammensetzung $C_{26}H_{42}$ bestehen. Heintz[17]) und Zwenger[18]) nennen dieselben Cholesterylene; letzterer erhielt

---

[13]) cf. die weiter unten beschriebene Darstellung des Cholesterins aus Lanolin.

[14]) Ann. Chem. Pharm. 192, 177.

[15]) Handb. d. physiol. Chemie.

[16]) Graham-Otto, Handb. der organ. Chemie.

[17]) Ann. Chem. Pharm. 76, 336.

[18]) id. 66, 5 und 69, 347.

dieselben auch durch Behandlung von Cholesterin mit conc. Schwefelsäure, und zwar im ganzen fünf Isomere.

Beim Erhitzen mit conc. Jodwasserstoffsäure erhielt Liebermann[19]) aus dem Cholesterin Kohlenwasserstoffe von der Formel $(C_{10} H_{16})_x$ und $C_{26} H_{44}$. Lässt man auf Cholesterin Oxydationsmittel einwirken, z. B. conc. Salpetersäure, so erhält man Essigsäure und andere flüchtige Säuren, daneben einen festen Rückstand, der als Cholesterin- oder Cholestensäure $C_{25} H_{42} O_3$ bezeichnet wird. Untersuchungen hierüber verdanken wir hauptsächlich Latschinow und Löbisch[20]), welche Silber- und Kupfersalze dieser Säure darstellten. Bei der Oxydation von Cholesterin mit Chromsäuremischung erhielt Löbisch eine Säure von der Formel $C_{24} H_{40} O_6$. Gasförmiges Chlor bildet aus Cholesterin Substitutionsprodukte, von denen hauptsächlich $C_{26} H_{42} Cl_2 O$, $C_{26} H_{38} Cl_6 O$ und $C_{26} H_{37} Cl_7 O$ bekannt sind. Letzteres Chlorcholesterin bildet ein weisses, lockeres Pulver, welches selbst in heissem Äther schwerlöslich ist.

Sehr energisch wirkt Phosphorpentachlorid auf Cholesterin ein und erzeugt daraus das Cholesterylchlorid $C_{27} H_{45} Cl$. Das Chlor ist in demselben so fest gebunden, als wenn es an einem aromatischen Kern hinge.

Auch Nitroverbindungen des Cholesterins sind bekannt. Beim Eintragen wasserfreien Cholesterins in kalte rauchende Salpetersäure scheidet sich eine ölige Masse ab, welche, aus Alkohol umkrystallisiert, sich als Dinitrocholesterin erweist[21]): $C_{26} H_{42} (NO_2)_2 O$.

Über die Einwirkung von Brom auf Cholesterin werde ich unten ausführlicher berichten.

Für die Aufklärung der Constitution des Cholesterins ist durch die oben genannten Versuche noch nicht viel gewonnen, bis jetzt liegt nur die Vermutung nahe, dass es in Beziehung zu den Terpenen steht. So giebt das von Zwenger[22]) dargestellte α-Cholesterylen mit HCl und Eisenchlorid dieselbe Reaktion wie Kampher und Terpentinöl. Liebermann zeigte 1885, dass ein Begleiter des Chinovins, welchen Giesel aufgefunden hatte, in naher Beziehung zum Cholesterin stehe; er nannte denselben anfangs Oxychinoterpen, später Cholestol

---

[19]) Ber. d. d. chem. Ges. 18, 1808.

[20]) Ber. d. d. chem. Ges. 5, 510.

[21]) Preis und Reymann, Ber. d. d. chem. Ges. 12, 224.

[22]) a. a. O.

und fand bei seinen Versuchen eine Reaktion, welche sich in derselben Weise wie beim Cholestol auch beim Cholesterin zeigt. Man löst das Cholesterin in Essigsäureanhydrid und fügt unter Abkühlung tropfenweise conc. Schwefelsäure hinzu. Es tritt hierbei zunächst eine rosenrote Färbung auf, welche jedoch bald einer Blaufärbung Platz macht. Je weniger concentriert indes die Cholesterinlösung ist, desto leichter geht der blaue Farbenton allmählich in einen blaugrünen und schliesslich in einen grasgrünen über; diese grüne Farbe ist weit beständiger als die blaue. Sind die Lösungen ganz verdünnt, so ist eine Rotfärbung nicht mehr wahrzunehmen, ebenso nicht die Blaufärbung. Durch mehrfache Versuche konnte ich jedoch konstatieren, dass, wenn die verdünnte Lösung etwa 10 Minuten steht, eine deutliche Grünfärbung auftritt.

Burchard[23]) löst Cholesterin in Chloroform, fügt hierzu eine kleine Menge Essigsäureanhydrid und einen bis zwei Tropfen Schwefelsäure; es tritt alsdann dieselbe Reaktion wie oben ein.

Erwähnt seien hier noch zwei weitere Reaktionen. Verdampft man eine kleine Menge Cholesterin mit einem Tropfen conc. Salpetersäure bei gelinder Wärme, so bleibt ein gelber Fleck, der, noch warm mit einem Tropfen Ammoniak benetzt, rot wird. (Reaktion von Schiff.)

Versetzt man 2 cg Cholesterin mit 2 cc Chloroform und 2 cc Schwefelsäure, so färbt sich beim Umschütteln nach kurzer Zeit das Chloroform blutrot, dann kirschrot bis purpurn, während die Schwefelsäure eine stark grünliche Fluorescenz zeigt (Hesse)[24]).

Den Alkoholcharakter des Cholesterins hat Berthelot nachgewiesen. Er behandelte dasselbe mit Natrium und erhielt eine dem Natriumalkoholat ähnliche Verbindung, das Cholesterinnatrium; auch gelang es demselben Forscher, durch Einwirkung von niederen und höheren Fettsäuren auf dasselbe, Cholesterylfettsäureester darzustellen: so durch mehrstündiges Erhitzen von Cholesterin mit Stearinsäure und Palmitinsäure im geschlossenen Rohr bei 200° den Stearinsäure- und Palmitinsäurecholesterylester, Verbindungen, welche wir im Wollfett antreffen und welche Liebreich als Cholesterinfette bezeichnet.

Das Cholesterin kann demnach als ein höherer Alkohol be-

---

[23]) Ann. Chem. Pharm. 211, 1283.

[24]) Inaugural-Dissert., Rostock 1889.

trachtet werden, welcher sich mit Säuren zu Estern verbindet. Diese Ester sind schön krystallisierte Körper, welche auch interessante physikalische Eigenschaften darbieten, wie ich unten ausführlich zeigen werde.

Was die Entstehung des Cholesterins anbelangt, so gehen im allgemeinen die Ansichten der Forscher bis jetzt dahin, dass das Cholesterin ein Spaltungsprodukt der Eiweisskörper sei, eine Ansicht, welche sich darauf gründet, dass überall, wo ein Zerfall von Eiweisskörpern statthat, Cholesterin sich stets in grösserer Menge vorfindet.

Schulze und Barbieri haben hierüber weitere Versuche angestellt, welche jedoch noch keine positiven Resultate ergaben; nur soviel bestätigt sich, dass das Cholesterin in den etiolierten Keimlingen neben Amidosäuren u. s. w. stets auftritt.

Über das Molekulargewicht des Cholesterins existieren verschiedene Angaben, eine der am häufigsten benutzten Formeln, $C_{26} H_{43} OH$ findet sich in Gmelins Handbuch der organischen Chemie[25]). Latschinow und Walitzky sprechen der Formel $C_{25} H_{42} OH$ die grössere Wahrscheinlichkeit zu, ebenso Hesse[26]). Auch Liebermann[27]) schliesst sich den Ausführungen von Latschinow und Walitzky an. Weitere Untersuchungen hierüber hat in letzter Zeit Reinitzer[28]) angestellt, welcher versuchte, durch Verseifung des von Berthelot[29]) und Schulze[30]) dargestellten Cholesterylbenzoats, eines in grossen Tafeln krystallisierenden Körpers, das Verhältnis zu bestimmen, in welchem Benzoësäure und Cholesterin in dem Ester vorhanden sind, um hieraus exakte Schlüsse auf die Molekulargrösse des Cholesterins zu ziehen; die Resultate dieser Versuche waren jedoch nicht entscheidend.

Wislicenus und Moldenhauer[31]) fanden, dass das Cholesterin sich leicht bromieren lässt und stellten fest, dass eine Molekel Cholesterin zwei Atome Brom aufnimmt.

Reinitzer modifizierte diese Bromierung dahin, dass er das Brom

---

[25]) Bd. IV, pag. 2093.

[26]) Liebigs Annalen 192, 175.

[27]) Ber. d. d. chem. Ges. 18, 1803.

[28]) Wiener Monatshefte 1880, Heft 5.

[29]) Ann. de chim. [3] 56, 54.

[30]) Journ. f. pr. Chemie [2] 7, 170.

[31]) Liebigs Annalen 146, 178.

nicht direkt auf Cholesterin, sondern auf dessen Acetylverbindung einwirken liess. Er ging dabei von der Annahme aus, dass reines Cholesterin sich bei der Einwirkung von Brom leichter verändere als sein Acetat, was sich auch bestätigte. Ausserdem zeichnet sich das Acetat und dessen Bromid durch eine weit schwerere Löslichkeit in Alkohol aus, als das nicht acetylierte Cholesterin, eine Reindarstellung ist daher auch auf diesem Wege viel leichter zu bewerkstelligen. Reinitzer erhielt so das Bromcholesterylacetat, eine schön krystallisierte Verbindung, die sich als ein Bromadditionsprodukt von der Formel $C_{27} H_{45} Br_2 C_2 H_3 O_2$ erwies. Aus den Zahlen, welche ihm die Analysen dieser Verbindung lieferten, ist ersichtlich, dass derselben die obige Molekularformel zukommt.

Da das Verhältnis zwischen Kohlenstoff und Brom besser als das zwischen Kohlenstoff und Wasserstoff zur Feststellung der Anzahl der Kohlenstoffatome in der Cholesterinmolekel dienen kann, so ist die Verwendung solcher Bromverbindungen zur Feststellung der Formel des Cholesterins jedenfalls vorzuziehen; ich stellte daher weitere bromierte Ester dar, deren Analysen Zahlen ergaben, welche für 27 Kohlenstoffatome und 45 Wasserstoffatome in der Cholesterinmolekel sprechen, wenigstens des Cholesterins, welches ich aus menschlichen Gallensteinen dargestellt hatte.

Die Analyse des Cholesterylchlorids (Planer)[32]), des Natriumcholesterylats (Lindenmeyer)[33]) und des unten angeführten Kaliumcholesterylats stimmen ebenfalls besser für die Formel mit 27 Kohlenstoffatomen, desgleichen die des von Hoppe-Seyler dargestellten sogenannten Essigsäure-Cholesterins, einer Verbindung von Cholesterin mit Eisessig.

Die Analysen des Bromids nach Wislicenus und Moldenhauer und des Amins nach Löbisch[34]) nähern sich mehr der Formel mit 26 Kohlenstoffatomen.

Man hat also noch die zwei Formeln $C_{26} H_{43} OH$ und $C_{27} H_{45} OH$ zu berücksichtigen; ein zwingender Beweis für die Richtigkeit einer derselben existiert aber vorerst noch nicht. Nach den Ergebnissen meiner Analysen neige ich mich jedoch mehr der Annahme einer Formel mit 27 Kohlenstoff- und 46 Wasserstoffatomen zu.

---

[32]) Liebigs Annalen 118, 25.

[33]) Journ. f. pr. Chemie 90, 321.

[34]) Ber. d. d. chem. Ges. 5, 513.

Übrigens ist eine Verschiedenheit im Molekulargewicht, wie Hesse[35]) zeigt, auch dadurch zu erklären, dass es mehrere Cholesterine giebt, welche als untereinander homolog oder isomer betrachtet werden müssen. Die Richtigkeit dieser Annahme steht jetzt ausser Zweifel, neben dem schon oben erwähnten, von Schulze entdeckten Isocholesterin finden wir jetzt das von Hesse dargestellte Phytosterin[36]) $C_{26}H_{44}O + H_2O$ aus der Calabarbohne, von welchem der Autor annimmt, dass es sich im tierischen Körper häufig neben dem Gallensteincholesterin finde.

Schulze und Barbieri[37]) fanden in den Wurzeln der Lupinen das Caulosterin, Reinecke und Rodewald[38]) in der Lohblüte der Gerber (Aethalium septicum) das Paracholesterin.

Alle diese Körper stehen in naher Beziehung zu dem früher allein bekannten Gallensteincholesterin und führen mit Recht den Namen Cholesterine. Die aus den Pflanzen dargestellten, wie neuerdings das Lupeol, Cupreol und Quebrachol, führen den besondern Gattungsnamen Phytocholesterine. Sie zeigen alle gegen gewöhnliche Lösungsmittel ein gleiches Verhalten, ihre Lösungen drehen, mit Ausnahme des Isocholesterins, die Polarisationsebene nach links; auch geben sie alle die Liebermannsche Cholestolreaktion.

Von dem Phytosterin stellte Hesse[39]) das Acetat her, atlasglänzende Blättchen vom Schmelzpunkt 132°—133°, die demselben Krystallsystem (klinorhombisch) angehören, wie beim Cholesterylacetat, dessen Schmelzpunkt aber bei 92° liegt.

Die Charakterisierung dieser einzelnen, einander sehr ähnlichen Alkohole kann nur dadurch bewirkt werden, dass eine grössere Anzahl ihrer Verbindungen dargestellt und in ihren Eigenschaften genau untersucht und untereinander verglichen werden.

Von diesem Gesichtspunkt ausgehend, habe ich auf Veranlassung des Herrn Professor Dr. A. Kossel in der chemischen Abteilung des physiologischen Institutes zu Berlin die Darstellung verschiedener neuer Derivate dieser Alkohole, speziell des Cholesterins und des Isocholesterins unternommen und, gestützt auf die dabei

[35]) Liebigs Annalen 192, 175.
[36]) Liebigs Annalen 122, 249.
[37]) Ber. d. d. chem. Ges. 6, 251.
[38]) Ann. 207, 229.
[39]) Ann. Chem. Pharm. 228, 96.

gewonnenen Resultate, auch versucht, für das Cholesterin eine zuverlässige Methode der quantitativen Bestimmung ausfindig zu machen.

Herrn Professor Dr. Kossel, meinem hochverehrten Lehrer, spreche ich an dieser Stelle für die Anregung zu dieser Arbeit und den mir freundlichst gewährten Rat und Beistand meinen bleibenden Dank aus; Herrn Regierungsrat Dr. Schotten bin ich für sein wohlwollendes Entgegenkommen und das freundliche Interesse, welches er meinen Untersuchungen schenkte, zu bestem Dank verpflichtet.

Im Folgenden möchte ich nun zunächst die Darstellung verschiedener Abkömmlinge des Cholesterins, sowie die Beschreibung ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften mitteilen. Das Cholesterin, welches zu den hier zu beschreibenden Versuchen benutzt wurde, stellte ich aus menschlichen Gallensteinen dar. Zu diesem Zwecke wurden dieselben fein pulverisiert, alsdann mit Alkohol, dem etwas Äther zugesetzt war, vermischt. Auf 70 g Pulver verwendet man 2—2½ l Alkohol; die Mischung wird wiederholt energisch durchgeschüttelt und am Rückflusskühler ca. 1 Stunde auf dem Wasserbade gekocht (es empfiehlt sich, hierbei zur Vermeidung des Aufstossens eine Platinspirale einzulegen oder einen Luftstrom einzuleiten). Die rotgelb gefärbte, heisse Lösung wird rasch filtriert; bei ihrem Erkalten scheidet sich Cholesterin in perlmutterglänzenden Schuppen aus, welche man wiederholt aus Alkohol umkrystallisiert. Zur Darstellung ganz reiner Substanz löst man das so zweimal umkrystallisierte Cholesterin in Eisessig, wobei sich das schon erwähnte Essigsäure-Cholesterin[40]) bildet, welches, abfiltriert und mit Alkohol gekocht, die Essigsäure wieder abgiebt, so dass nach dem Erkalten der Lösung Cholesterin sich in feinen seideglänzenden Krystallen ausscheidet, welche abgesaugt, mit verdünntem Alkohol gewaschen und bei 110° getrocknet werden.

Das so erhaltene Cholesterin zeigte einen Schmelzpunkt von 145,5°; das hierbei benutzte Thermometer war genau calibriert und mit Zehntelgradteilung versehen.

[40]) Wohl zu unterscheiden ist dieses Essigsäurecholesterin von dem von Berthelot (Ann. chim. [3] 56, 54) durch Schmelzen mit Essigsäure im geschlossenen Rohre und von Löbisch (Ber. 5, 513) durch Behandeln von Cholesterin mit Acetylchlorid dargestellten Cholesterylacetat, dem Cholesterylester der Essigsäure: $CH_3 \cdot COO\, C_{27} H_{45}$!

I. Cholesterin.

Cholesterinnatrium.

Die einfachsten Verbindungen, welche das Cholesterin einzugehen imstande ist und welche am leichtesten dargestellt werden können, sind die mit den Alkalimetallen.

Das Cholesterinnatrium ist von Lindenmeyer[1]) und Reinitzer[2]) in der Art dargestellt worden, dass sie das Cholesterin in Steinöl lösten, blankes metallisches Natrium zugaben und das Ganze erwärmten. Dieses Erwärmen ist überflüssig, und für die Darstellung erweist sich die Anwendung von reinem, absolutem Äther (welcher über Natrium destilliert ist und über Phosphorpentoxyd aufbewahrt wird) statt des von den obigen Autoren angewendeten Steinöls geeigneter.

Man löst das Cholesterin in dem absoluten Äther, giebt die äquivalente Menge blankes metallisches Natrium dazu und lässt einige Stunden bei gewöhnlicher Temperatur stehen. Die Natriumstückchen überziehen sich mit einer weissen Kruste von Cholesterinnatrium, die man durch Schütteln lostrennt, so dass die blanke Oberfläche des Metalles wieder sichtbar wird und die Reaktion von neuem beginnen kann. Öfteres Umschütteln ist zur Vollendung des Prozesses erforderlich; die Bewegung, welche der Äther bei etwaigem Sieden erfährt, würde nicht hinreichen, um die Cholesterinnatriumschichten von dem metallischen Natrium loszutrennen. Die Angaben Lindenmeyers[3]) betreffs der Löslichkeit des Cholesterinnatriums in Chloroform und seine leichte Zersetzlichkeit durch Kohlensäure sind nicht ganz zutreffend. Lindenmeyer giebt an, dass Cholesterinnatrium sich leicht in Chloroform löse. Nach den von mir angestellten Versuchen ist es in Chloroform nur gelatinös verteilt und lässt sich diese Flüssigkeit nur schwer filtrieren. Leitet man längere Zeit feuchtes Kohlensäuregas in das cholesterinnatrium-

[1]) Journ. f. pr. Chemie 90, 321.

[2]) Monatshefte f. Chemie 9, 421.

[3]) a. a. O.

haltige Chloroform, so scheidet sich kein Natriumcarbonat aus. Auch beim Stehen an der Luft verändert sich die Verbindung erst nach längerer Zeit. Durch Kochen mit Wasser wird sie allmählich zersetzt. Am raschesten zersetzt sie Alkohol, und zwar verlief der Zersetzungsprozess nach meinen Versuchen am schnellsten bei 96 prozentigem Alkohol.

Cholesterinkalium.

Die Darstellung dieser Verbindung ist analog der oben beschriebenen Darstellung von Cholesterinnatrium. Sobald das Kalium in die ätherische Lösung des Cholesterins hineingebracht wurde, ging schon in der Kälte die Reaktion mit grosser Heftigkeit unter energischer Wasserstoffentwickelung vor sich. Es wurde, wie beim Cholesterinnatrium, wasser- und alkoholfreier Äther angewandt, und es genügt daher dieses Experiment, um die Ansicht Walitzkys[4]), nach welcher bei der Einwirkung von Natrium auf Cholesterin keine Wasserstoffentwickelung sich bemerkbar mache, gänzlich zu widerlegen, da nicht vorausgesetzt werden kann, dass die Einwirkung des metallischen Natriums in einer andern Weise verlaufe, als diejenige des Kaliums.

Das Cholesterinkalium besitzt ganz ähnliche Eigenschaften wie das Cholesterinnatrium; erwähnen möchte ich an dieser Stelle, dass beide in Benzol, Toluol und Petroläther unlöslich sind.

Die Zusammensetzung dieser Substanz wurde durch die Einwirkung von verdünnter Salzsäure auf eine abgewogene Menge der bei 100° getrockneten Kaliumverbindung ermittelt, wodurch das Cholesterin zur Abscheidung gebracht wird. Die vom Cholesterin abfiltrierte, das Kalium enthaltende Flüssigkeit wurde eingedampft und der Rückstand gewogen; das abgeschiedene Cholesterin wurde der Analyse unterworfen. Ich fand auf diese Weise folgende Resultate:

I. 0,2002 g Substanz gaben 0,0369 g KCl, 0,5885 g CO_2 und 0,2017 g H_2O.

II. 0,2201 g Substanz gaben 0,0384 g KCl, 0,6161 g CO_2 und 0,2108 g H_2O.

Berechnet für:		Gefunden:	
$C_{26}H_{43}OK$	$C_{27}H_{45}OK$	I	II
K 9,51	9,19	9,18	9,13
C 76,09	76,41	76,35	76,32
H 10,48	10,61	10,65	10,63

[4]) Journ. d. russ. pyhs.-chem. Ges. 8, 235.

Die Resultate stimmen besser mit der Formel $C_{27}H_{45}OK$ überein, als mit der andern.

Cholesterylpropionat.

Diese Verbindung bietet ein besonderes Interesse dar, weil sie beim Schmelzen und nachherigen Abkühlen Farbenerscheinungen zeigt, schöner als irgend ein bis jetzt dargestelltes Derivat des Cholesterins. Das Auftreten dieser Farbenerscheinungen bei den Cholesterinverbindungen ist schon von früheren Autoren, wie Planer[5]), Reymann[6]), Latschinow beobachtet worden.

Die Darstellung dieser Substanz geschieht in folgender Weise: Man mischt 10 g bei 100° gut getrocknetes Cholesterin mit etwa 5 g Propionsäureanhydrid in einem Kolben und erhitzt das Gemisch eine halbe Stunde lang auf dem Wasserbade; alsbald bildet sich eine weingelbe Lösung, bei deren Erkalten eine weisse, fettglänzende, zähe Masse sich ausscheidet, welche ein krystallinisches Gefüge besitzt. Löst man diese in Äther und fügt Alkohol hinzu, so fällt der Propionsäureester des Cholesterins in Kryställchen aus. Zur vollständigen Reinigung wird die Ausfällung mit Alkohol aus der ätherischen Lösung einige Male wiederholt. Die Verbindung krystallisiert in cholesterinartigen, klinorhombischen Blättchen, deren Schmelzpunkt bei 98° liegt. Sie zeichnet sich durch ihre leichte Löslichkeit in Äther, Benzol, Petroläther und Schwefelkohlenstoff aus, schwerer löslich ist sie dagegen in Alkohol. Die besten Krystalle erhält man durch langsames Verdunsten einer ätheralkoholischen Lösung.

Bei der Elementaranalyse lieferten 0,2201 g Substanz 0,6533 g Kohlensäure und 0,2279 g Wasser.

	Berechnet für:		Gefunden:
	$C_2H_5COOC_{26}H_{43}$	$C_2H_5COOC_{27}H_{45}$	
C	81,30	81,44	81,37
H	11,21	11,31	11,51

Dieser Propionsäure-Cholesterylester[6a]) zeigt nun im geschmolzenen Zustande bei seiner allmählichen Abkühlung ein prachtvolles Farbenspiel von ganz ausgezeichneter Schärfe, welches wohl imstande ist, das Propionsäureanhydrid als ein brauchbares Reagens auf Cholesterin erscheinen zu lassen, umsomehr, als weder die Alkohole der fetten

[5]) Ann. Chem. Pharm. 118, 25.

[6]) Bull. de la Soc. Chim. de Paris 47, 898.

[6a]) Verh. d. Physiol. Ges. zu Berlin. XV. Sitzg., 1889, S. 9.

noch der aromatischen Reihe, noch auch die Terpene, zu welchen alle das Cholesterin in Beziehung steht, auch nur annähernd ähnliche Erscheinungen zeigen. Es kann ausserdem der Versuch selbst mit den geringsten Mengen von Cholesterin angestellt werden.

Beim Propionat sind nun folgende Erscheinungen zu beobachten: die geschmolzene Verbindung wird beim Abkühlen zunächst violett, dann allmählich blau, smaragdgrün, dunkelgrau, orange, carminrot und kupferrot. Die prachtvoll tiefblaue Farbe, sowie die grüne erhalten sich längere Zeit ungemein scharf. Bei plötzlichem Abkühlen der Schmelze entsteht die kupferrote Farbe, welche ebenfalls längere Zeit andauert; die blaue Farbe kann lange Zeit in der Weise erhalten werden, dass man die in einem Kölbchen befindliche Substanz in eine auf 98° erwärmte Glycerinlösung taucht und so zum Schmelzen bringt. Bei den andern Farben gelingt der Versuch, dieselben einige Zeit andauernd zu erhalten, nicht in gleicher Weise.

Man beobachtet die Erscheinungen nur im zurückgeworfenen Lichte, im durchfallenden Lichte sind dagegen die Complementairfarben sichtbar. Bei der Betrachtung unter dem Mikroskop im durchfallenden Lichte treten folgende Vorgänge auf: die geschmolzene Substanz ist zuerst bleigrau, dann blaugrau und hellblau und dabei fortwährend in lebhafter Bewegung begriffen. Plötzlich tritt ein Stillstand ein und es erscheinen dann Gruppen sphäroidisch angeordneter Krystalle, welche bei gekreuzten Nicols ein schwarzes Kreuz haben, demnach aus radial gestellten, doppeltbrechenden Krystallen bestehen. Die Masse gerät nach kurzer Pause wieder in Bewegung, welche etwas stärker ist: plötzlich verschwinden die schwarzen Kreuze, es entsteht eine rötlich-gelbe Farbe, dann eine violette, eine blaue, hellgrüne und dunkelgrüne. Die letztere verschwindet plötzlich, und man erblickt wieder sphärische Aggregate von doppeltbrechenden Krystallen, die jedoch bedeutend grösser sind als die ersten.

Die beim Schmelzen anderer Cholesterinderivate auftretenden Farbenerscheinungen sind zuerst von Löbisch[7]) beim Cholesterylamin beobachtet worden. Dasselbe zeigt eine bläulich-violette „Fluorescenz". Latschinow[8]) beobachtete beim Schmelzen des Silbersalzes der Cholestensäure das Auftreten einer stahlblauen Färbung. Rei-

[7]) Ber. d. d. chem. Ges, 5, 513.

[8]) Ber. d. russ. phys.-chem. Ges. 8, 237.

nitzer[9]) fand beim Abkühlen des geschmolzenen Cholesterylacetats ähnliche Färbungen, wie ich beim Cholesterylpropionat.

Ob diese Phänomene zusammenhängen mit den Farbenerscheinungen dünner Blättchen, mit der Beugung und Interferenz des Lichtes, ist schwer zu sagen.

Lehmann[10]) hat diese Farbenerscheinungen genauer untersucht; er beobachtete am Acetat und Benzoat des Cholesterins, dass sie mit der Ausscheidung und Wiederauflösung einer bis jetzt unbekannten krystallisierten Substanz zusammenhängen; dasselbe geht aus obigen Untersuchungen am Propionat hervor. Diese farbenerzeugende Substanz zeigt chromatische Polarisation in schönster Weise. Beim Cholesterylacetat fand Lehmann drei Krystallformen, deren zwei monosymmetrisch sind, während die dritte nicht bestimmt werden konnte; auch das Benzoat existiert nach Lehmann in drei Modifikationen, deren erste die leicht zu beobachtenden tetragonalen Krystalle sind; die zweite Modifikation ist rhombisch, die dritte noch nicht bestimmt. Diese Modifikationen stehen beim Benzoat zu einander im Verhältnis der Monotropie, beim Acetat sind sie zu einander teils enantiotrop, teils monotrop.

Wie schon oben angeführt, lässt sich die Farbenerscheinung mit Hülfe sehr geringer Mengen von Cholesterin hervorrufen und kann deshalb zur Unterscheidung desselben von andern ähnlichen Substanzen benutzt werden.

Ausführung der Reaktion.

Zur Ausführung der Reaktion verfährt man wie folgt:

Man sucht das in einem Körper etwa vorhandene Cholesterin so gut wie möglich zu isolieren; nunmehr wird ein ganz kleines Körnchen der isolierten und bei 100° völlig getrockneten Substanz in einem trockenen Reagensglase mit zwei bis drei Tropfen Propionsäureanhydrid versetzt, das Gemenge vorsichtig über einer kleinen Flamme erwärmt und nach einiger Zeit das überschüssige Säureanhydrid durch stärkeres Erwärmen des ganzen Glases verflüchtigt. Beim raschen Erkalten entsteht die oben erwähnte fettglänzende Masse. Die Farbenerscheinung ist sehr deutlich zu beobachten, wenn man einige Körnchen dieser Masse an einem Glasstabe bis zum Schmelzen erhitzt und den Stab dann während des Abkühlens vor einem

[9]) Wiener Monatshefte 5 (1888), 429.

[10]) Molekularphysik, Leipzig 1889. Bd. II, 586.

dunkeln Grunde betrachtet. Wie selbst die geringsten Spuren von Cholesterin, welche irgend einer Substanz beigemengt sind, imstande sind, beim Schmelzen derselben mit Propionsäureanhydrid und nachherigem Erkalten obige Farbenerscheinungen hervorzurufen, werde ich unten beim Isocholesterin Gelegenheit haben zu zeigen. Wie oben erwähnt, kann die Farbenerscheinung nur dann dauernd erhalten werden, wenn man die Temperatur der Masse auf 98° hält; anders ist dies beim Cholesterylchlorid, welches Planer und Reymann[11]) durch Behandeln von Cholesterin mit Phosphorpentachlorid darstellten. Beim Cholesterylchlorid treten während des Erkaltens der geschmolzenen Verbindung ähnliche Erscheinungen auf, aber die blaue fluorescierende Farbe der erkalteten Schmelze erhält sich mehrere Tage lang. Ich machte ferner bei dieser Verbindung die Beobachtung, dass, wenn man ihre ziemlich concentrierte Lösung in Äther in einem Reagensglas umschwenkt und dann ausschüttet, das Glas im auffallenden Lichte eine schöne azurblaue Färbung annimmt, welche sich längere Zeit in gleicher Intensität erhält.

Unter gewöhnlichen Verhältnissen verbinden sich nur die Anhydride der Säuren mit dem Cholesterin zu Estern; will man die Esterbildung durch die Säuren selbst ermöglichen, so muss man diese mit Cholesterin im zugeschmolzenen Rohre erhitzen.

Ich möchte hier noch anführen, dass man Cholesterin ebenfalls mit Propionsäureanhydrid und concentrierter Schwefelsäure nachweisen kann. Es bilden sich dieselben Farbenerscheinungen, wie mit Essigsäureanhydrid bei der Liebermannschen Reaktion.

Überhaupt treten diese Färbungen bei Anwendung der verschiedensten organischen Säureanhydride und Zusatz von Schwefelsäure auf; so z. B. braucht man nur Isobuttersäureanhydrid, Benzoësäureanhydrid oder Phtalsäureanhydrid mit Cholesterin in Benzol oder Chloroform zu lösen, so nimmt die Lösung auf Zusatz von Schwefelsäure meist blaue Farbe an.

Oxalsäurecholesteryläthylester.

$$\begin{matrix} COOC_{27}H_{45} \\ | \\ COOC_2H_5 \end{matrix}.$$

Von den bekannteren zweibasischen Säuren bilden die Oxal-

[11]) Liebigs Annalen 118, 25.

säure und die Bernsteinsäure mit dem Cholesterin Esterverbindungen. Einen Dicholesteryloxalsäureester von der Formel

$$\begin{array}{l} COOC_{27}H_{45} \\ | \\ COOC_{27}H_{45} \end{array}$$

vermochte ich nicht herzustellen, sondern nur den Oxalsäurecholesteryläthylester

$$\begin{array}{l} COOC_{27}H_{45} \\ | \\ COOC_2H_5 \end{array}.$$

Zur Darstellung dieser Verbindung geht man vom neutralen Oxalsäureäthylester aus, indem man denselben zunächst in Chloroxalsäureäthylester umwandelt, welch letzterer die Fähigkeit besitzt, mit Alkoholen sehr energisch unter Bildung von neutralen Estern zu reagieren.

Die Darstellung desselben wurde nach der zuerst von V. v. Richter[12]) angegebenen und später von Anschütz[13]) näher ausgeführten Methode folgendermassen bewerkstelligt:

In einen Rundkolben von 100 cc Inhalt giebt man 20 g Äthyloxalat und 14 g Phosphorpentachlorid, und kocht auf dem Wasserbade mit aufgesetztem Kühler längere Zeit, bis das gelbe Phosphorpentachlorid verschwunden ist und keine Chloräthyldämpfe mehr entweichen. Durch wiederholte fraktionierte Destillation trennt man den Chloroxalsäureester von dem gebildeten Phosphoroxychlorid. Ob im Destillat noch Phosphoroxychlorid enthalten, zeigt sich schon an dem bedeutend stechenderen Geruch und dem stärkeren Rauch, den dasselbe entwickelt. Vor zu langem Erhitzen muss man sich aber hüten, weil sonst Trichloressigsäureester entsteht.

Erhitzt man nun diesen Chloroxalsäureester mit der äquivalenten Menge von Cholesterin kurze Zeit auf eine Temperatur von 110°, so stellt das Reaktionsprodukt nach dem Erkalten eine zähe, stearinartige Masse vor, die sich nur schwer in Äther löst. Beim langsamen Verdunsten der ätherischen Lösung scheiden sich dünne Krystallblättchen ab, deren eigentümliche Form unter dem Mikroskop zu erkennen ist. Sie erscheinen als gleichseitige Dreiecke,

[12]) Ber. d. d. chem. Ges. 10, 2228.

[13]) Ber. d. d. chem. Ges. 21, 2159.

an welchen zwei Ecken durch Seiten ersetzt sind, die den gegenüberliegenden Seiten des gleichseitigen Dreiecks parallel laufen.

Leichter als in Äther löst sich die Verbindung in Chloroform. Ihr Schmelzpunkt ist im Vergleich zu den andern Verbindungen des Cholesterins ein sehr hoher; er liegt bei 225°. Jedoch scheint beim Schmelzen eine Zersetzung einzutreten, denn die dabei entstehende hellgelbe Masse erstarrt nicht wieder bei der Abkühlung, jedoch beobachtet man während des Erkaltens smaragdgrüne Farbenerscheinungen.

Analysen:

I. 0,2202 g Substanz gaben 0,6175 g CO_2 und 0,2043 g H_2O.

II. 0,2104 g Substanz gaben 0,5889 g CO_2 und 0,1956 g H_2O.

Berechnet für:		Gefunden:	
$COO\,C_{26}H_{43}$ / $COO\,C_2H_5$	$COO\,C_{27}H_{45}$ / $COO\,C_2H_5$	I	II
C 76,27	76,54	76,47	76,33
H 10,06	10,28	10,30	10,31

Beim Kochen mit Wasser wird die Verbindung nicht zersetzt, durch wässerige Alkalien erst nach langer Zeit; mit alkoholischem Kali und mit Natriumalkoholat wird sie in kurzer Zeit in ihre Bestandteile zerlegt.

Bernsteinsäurecholesterylester.

(Cholesterylsuccinat.)

Die Bernsteinsäure selbst wirkt nicht auf Cholesterin ein. Um den Bernsteinsäurecholesterylester zu erhalten, wendet man das Succinylchlorid an, welches als starkes Säurechlorid energisch auf alle Alkohole reagiert.

Schon in verdünnter Lösung des Chlorids macht sich eine Einwirkung auf Cholesterin bemerkbar. Man kann nun zur Darstellung des Esters zwei Wege einschlagen. Entweder lässt man das Säurechlorid in Äther, Benzol, Toluol oder Petroläther gelöst auf Cholesterin wirken, oder man erwärmt direkt Cholesterin mit Succinylchlorid. Im erstern Falle verläuft der Prozess beinahe quantitativ, jedoch muss man mindestens 24 Stunden am Rückflusskühler kochen; im zweiten Falle erhält man gegen 85 % Ausbeute und der Prozess ist in wenigen Minuten beendigt. In einem Kölbchen schmilzt man

wassertreies Cholesterin mit Succinylchlorid zusammen, bei einer Temperatur von 140°. Bei niedrigerer Temperatur bildet sich die Verbindung nicht; erhitzt man andererseits über 150°, so wird viel von dem angewandten Cholesterin zerstört. Es entwickeln sich bei der Reaktion Salzsäuredämpfe; sobald die Bildung derselben nachlässt, unterbricht man den Schmelzprozess. Bei 5 g Cholesterin währt derselbe ungefähr 8—10 Minuten; schmilzt man länger, so wird die Ausbeute geringer. Die Schmelze ist nach dem Erkalten eine hellgelbe, zähe, harzartige Masse. Man löst sie in Äther und versetzt diese Lösung mit Alkohol, welcher den gebildeten Bernsteinsäurecholesterylester zum Ausfallen bringt. Die beim Schmelzprozess gebildeten Harze bleiben in der ätheralkoholischen Lösung zurück. In grössern Mengen von Äther, welchem man etwas Alkohol zusetzt, wird der Ester mehrmals gelöst und umkrystallisiert. Der reine Ester löst sich ziemlich wenig in Äther; in Alkohol ist derselbe unlöslich, leichter löslich in Benzol, Toluol, Petroläther, ganz leicht in Schwefelkohlenstoff und Chloroform. Der Schmelzpunkt desselben liegt bei 210°; wenige Grade höher treten smaragdgrüne Farben, mit Kupferrot vermischt, auf, welche indess bald wieder verschwinden. Erhitzt man über der freien Flamme im Reagensglas Cholesterin oder Cholesterinverbindungen mit Succinylchlorid im Überschuss, so bildet sich eine lauchgrüne Flüssigkeit, deren Farbe sich mehrere Tage erhält.

Der Bernsteinsäurecholesterylester krystallisiert in wohlausgebildeten Nadeln. Wegen seiner geringen Löslichkeit in Äther und seiner Bildungsweise machte ich einen Versuch, ihn für eine quantitative Bestimmung des Cholesterins in Fetten zu verwenden. Ich löste cholesterinhaltige Fette in Äther, gab Succinylchlorid zu und erhitzte am Rückflusskühler. Die erhaltenen Resultate waren jedoch nicht gut, und die sich ergebenden grösseren Differenzen sind wohl darauf zurückzuführen, dass Succinylchlorid in ätherischer Lösung den entstandenen Bernsteinsäurecholesterylester weit leichter zu lösen vermag, als Äther allein.

Betreffs der Einwirkung von Wasser, Alkalien und Natriumalkoholat auf den Ester gilt dasselbe wie bei den vorhergehenden Estern.

Analysen:

I. 0,2103 g Substanz gaben 0,6281 g CO_2 und 0,2098 g H_2O.

II. 0,2231 g Substanz gaben 0,6664 g CO_2 und 0,2215 g H_2O.

	Berechnet für:		Gefunden:	
$C_2H_4 < \begin{matrix} COO\,C_{26}H_{43} \\ COO\,C_{26}H_{43} \end{matrix}$		$C_2H_4 < \begin{matrix} COO\,C_{27}H_{45} \\ COO\,C_{27}H_{45} \end{matrix}$	I	II
C	81,35	81,49	81,45	81,44
H	10,89	11,00	11,08	11,02

Cholesterylbenzoat.

Diese Verbindung, welche durch ihre schönen tetragonalen Krystalle ausgezeichnet ist, wurde zuerst von Berthelot[14]) dargestellt, indem er einen Gewichtsteil Cholesterin mit der drei- bis vierfachen Menge Benzoësäure vermischte und das Gemisch mehrere Stunden lang im geschlossenen Rohr auf 160° erhitzte. Später stellte es Schulze[15]) durch Erhitzen von Cholesterin mit Benzoësäureanhydrid im Überschuss dar, wobei er eine bräunlich gefärbte Schmelze erhielt und aus ihr durch mehrmaliges Umkrystallisieren das reine Benzoat gewann. Reinitzer[16]) will diese gelbe Schmelze nicht erhalten haben. Er erhitzt 10 g wasserfreies Cholesterin mit 12 g Benzoësäureanhydrid in einem offenen Kölbchen etwa 1½ Stunden lang im Schwefelsäurebade auf 150—160°. Nach ihm gewinnt man so 60 % der theoretischen Ausbeute an reiner Verbindung.

Ich habe diese Darstellungsweise ebenfalls versucht, erhielt jedoch wie Schulze eine bräunlich gefärbte, harzige oder weiche Schmelze von eigentümlichem Geruch. Die Überführung in den Ester war wenig vollständig. Die harzigen Körper wurden mittels Ätheralkohol entfernt; die Ausbeute betrug ca. 75 %.

Ich fand eine sehr bequeme Darstellungsweise dieser Verbindung in der Einwirkung von Benzoylchlorid auf Cholesterin. Die Reaktion verläuft fast quantitativ und sehr rasch; das Verfahren ist folgendes: Man erhitzt wasserfreies Cholesterin mit wenig mehr als der äquivalenten Menge von Benzoylchlorid in einem Kölbchen auf 160°. Nach wenigen Minuten ist der Benzoësäureester gebildet. Zuerst erhält man eine gelblich weisse, zähe Masse, sie wird in Äther gelöst und aus der ätherischen Lösung mittels 96prozentigen Alkohols das Cholesterylbenzoat in Form eines rein weissen Pulvers ausgefällt, welches unter dem Mikroskop als aus Krystallen bestehend erscheint.

[14]) Ann. chim. phys. [3] 56, 54.
[15]) Journ. f. pr. Chemie [2] 7, 170.
[16]) Wiener Monatshefte 5 (1888), 435.

Schön ausgebildete Krystalle erhält man, wenn man die ätherische Lösung mit wenig Alkohol versetzt und nun ganz langsam verdunsten lässt, am besten in einem Rundkolben mit engem Halse.

Betreffs des Schmelzpunktes der erhaltenen Verbindung stimmen meine Beobachtungen mit denen von Reinitzer überein, die Substanz zeigte zwei Schmelzpunkte, bei 145° und bei 178,5°. Bei 145° ist sie zu einer opalisierenden Masse zusammengesintert; je höher man erhitzt, desto klarer wird diese, und bei 178,5° erscheint sie plötzlich tief violett und zugleich völlig klar. Nach den Untersuchungen von Lehmann tritt das Cholesterylbenzoat ähnlich wie das Propionat in drei Modifikationen auf, welche zu einander im Verhältnis der Monotropie stehen und verschiedene Schmelzpunkte zeigen. Sie werden durch Krystallisieren aus Lösungsmitteln, sowie durch rasches oder langsames Abkühlen des geschmolzenen Cholesterylbenzoats erhalten. Die Farbenerscheinung, welche beim Erkalten der Substanz aus dem Schmelzflusse eintritt, nimmt einen etwas andern Verlauf als beim Propionat. Bei der opalartig aussehenden Schmelze tritt plötzlich an einer Stelle die tief violettblaue Färbung auf, verbreitet sich schnell über die ganze Masse und verschwindet wieder. Die Masse wird abermals trübe und bei weiterer Abkühlung tritt eine Wiederholung der Farbenerscheinung auf; darauf geht sie in den krystallinischen Zustand über. Wie oben kurz erwähnt, hängt auch hier diese Farbenerscheinung mit dem Auftreten einer farbenerzeugenden Substanz zusammen, die chromatische Polarisation derselben ist jedoch keineswegs so stark wie beim Propionat, da viele Farben fehlen.

Reinitzer[17]) benutzt diese Farbenerscheinungen, um ein in der Wurzel der Möhre vorkommendes Cholesterin, das von Husemann[18]) „Hydrocarotin" genannt wurde, von dem Gallensteincholesterin zu unterscheiden. Er fand nämlich, dass das Hydrocarotylbenzoat die gleichen Farbenerscheinungen zeigt, nicht aber das Hydrocarotylacetat.

Das Cholesterylbenzoat ist schwer löslich in Äther, noch schwerer in Alkohol, leicht jedoch in Schwefelkohlenstoff; es wird durch Kochen mit Wasser nicht verändert, ebensowenig durch Kochen mit wässerigen Alkalien, leichter durch Kochen mit alko-

[17]) Wiener Monatshefte, 5 (1888), 438.

[18]) Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wiss. 94, 719.

holischer Kalilauge. Schnell wird es aber verseift, wenn man es in ätherischer Lösung mit Natriumalkoholat zusammenbringt. Wie dieser Prozess, über welchen A. Kossel und ich[19]) gelegentlich der von uns beschriebenen neuen Verseifungsmethode bereits berichteten, vor sich geht, werde ich unten ausführlich beschreiben.

Erhitzt man das Cholesterylbenzoat über seinen Schmelzpunkt, so zersetzt es sich und es sublimirt Benzoësäure.

Analysen:

I. 0,2103 g Substanz gaben 0,6416 g CO_2 und 0,1938 g H_2O.

II. 0,2203 g Substanz gaben 0,6722 g CO_2 und 0,2048 g H_2O.

Berechnet für		Gefunden	
$C_{26}H_{43}C_7H_5O_2$	$C_{27}H_{45}C_7H_5O_2$	I	II
C 83,19	83,26	83,11	83,20
H 10,08	10,20	10,22	10,30

Phtalsäurecholesterylester.

$$C_6H_4 < \begin{matrix} COO\,C_{27}H_{45} \\ COO\,C_{27}H_{45} \end{matrix}.$$

Ähnlich wie man durch Einwirkung von Benzoësäureanhydrid auf Cholesterin den Cholesterylbenzoësäureester erhält, wird durch Zusammenschmelzen von wasserfreiem Cholesterin mit Phtalsäureanhydrid der Phtalsäureester des Cholesterins erhalten. Man schmilzt längere Zeit bei 180°, am besten in einem cylindrischen Gefäss wegen der Sublimation des Phtalsäureanhydrids, im Ölbade. Man erhält eine harte, spröde Schmelze, die ganz das Aussehen hat wie Kolophonium. Sie wird in Äther gelöst; aus der ätherischen Lösung fällt auf Zusatz von Alkohol eine weisse krümlige Masse nieder. Diese wird abermals in siedendem Äther gelöst, filtriert, und zum Filtrat ein wenig Alkohol gesetzt. Nach einiger Zeit scheiden sich tafelförmige, wohlausgebildete Krystalle aus, die jedoch nicht so gross zu erhalten sind, wie die des Benzoësäureesters. Will man hier einigermassen grosse Krystalle erzielen, so muss man die ätherische Lösung äusserst langsam verdunsten lassen, mindestens 14 Tage lang. Der Schmelzpunkt der Verbindung liegt bei 182,5°. Bei dieser Temperatur schmilzt sie zu einer klaren Flüssigkeit und zeigt beim Abkühlen nur eine Farbenerscheinung, schwächer als alle bisher dargestellten Cholesterylester.

[19]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 14, Heft 6.

Die Verbindung ist durch schwere Löslichkeit in Äther ausgezeichnet; nur durch längeres Einwirken von siedendem Äther in grossem Überschuss ist eine Lösung derselben zu bewerkstelligen, und schon wenige Tropfen Alkohol genügen, um in der ätherischen Lösung eine sofortige Trübung zu erzeugen. Leicht löslich ist die Verbindung in Schwefelkohlenstoff und in Chloroform. Betreffs ihrer Zersetzung durch Wasser, Kali, alkoholisches Kali und Natriumalkoholat gilt das Gleiche, wie beim Benzoat.

Beim Erhitzen zerlegt sie sich erst weit über ihrem Schmelzpunkt, wobei Phtalsäureanhydrid destilliert.

Die Ausbeute ist keine gute und beträgt nach obigem Verfahren nicht mehr wie 35 % der theoretischen. Eine etwas bessere (40 %) erhält man, wenn man den ganzen Schmelzprozess im geschlossenen Rohr bei 180° vornimmt.

Analysen:

I. 0,2103 g Substanz lieferten 0,6358 g CO_2 und 0,1982 g H_2O.

II. 0,2202 g Substanz lieferten 0,6655 g CO_2 und 0,2079 g H_2O.

	Berechnet für		Gefunden	
$C_6H_4 <$	$COO\,C_{26}H_{43}$ / $COO\,C_{26}H_{43}$	$C_6H_4 <$ $COO\,C_{27}H_{45}$ / $COO\,C_{27}H_{45}$	I	II
C	82,37	82,48	82,44	82,42
H	10,29	10,42	10,47	10,49

Bromverbindungen des Cholesterins.

Wie schon oben bei den Bemerkungen über das Molekulargewicht des Cholesterins erwähnt ist, fanden Wislicenus und Moldenhauer[20]), dass das Cholesterin die Fähigkeit besitzt, sich mit zwei Atomen Brom zu vereinigen zu der Verbindung $C_{27}H_{45}Br_2OH$. Die Darstellung derselben ist folgende:

Man löst wasserfreies Cholesterin in Schwefelkohlenstoff und giebt dazu aus einer Bürette tropfenweise Brom in Schwefelkohlenstoff gelöst, bis eine gelbrote Farbe eintritt, welche nach längerem Stehen nicht verschwindet. Dann lässt man das Lösungsmittel bei gewöhnlicher Temperatur verdunsten. Es ist nicht ratsam, den Schwefelkohlenstoff durch Erhitzen auf dem Wasserbade zu verjagen, da hierbei leicht Zersetzungen eintreten, welche sich durch die Abscheidung einer dunkelgefärbten öligen bromhaltigen Flüssigkeit

[20]) Ann. Chem. Pharm. 146, 178.

bemerkbar machen. Nach dem Verdunsten bleibt eine harzartige, hellgelbe, spröde Masse zurück, die man in einer Reibschale mit Wasser verreibt, um so die letzten Spuren von Bromwasserstoff zu entfernen. Die abfiltrierte und ausgewaschene Substanz wird über Schwefelsäure im evacuierten Exsiccator getrocknet, alsdann in Äther gelöst und aus der gelben Lösung mittels Alkohol das Cholesterindibromür in Form eines weissen Niederschlages gefällt. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Äther erhält man das Cholesterindibromür in feinen Nadeln, welche den Schmelzpunkt 115° zeigen. Wird die Verbindung in Ätheralkohol gelöst, zur Lösung soviel Wasser hinzugefügt, dass noch keine milchige Trübung sich bildet, so scheidet sich auf Zusatz von Natriumamalgam das ganze Cholesterin in reinem Zustande aus.

Durch Kochen mit Alkohol wird das Cholesterindibromür vollständig zerstört und es scheidet sich ein dunkelbraunes, dickflüssiges Öl ab.

In gleicher Weise, wie das Cholesterin selbst, bilden die Ester desselben Additionsprodukte mit Brom, indem das mit dem Säurerest verbundene Cholesterylradikal $C_{27} H_{45}$ zwei Atome Brom aufnimmt. Diese bromierten Ester des Cholesterins sind von Interesse, da die Verhältniszahl des in ihnen enthaltenen Broms und Kohlenstoffs eine gute Stütze für die Bestimmung des Molekulargewichts abgiebt.

Von diesen Verbindungen war bisher nur das Dibromcholesterylacetat bekannt (Reinitzer)[21]).

Ich habe nun folgende neu dargestellt.

Dibromcholesterylpropionat.

$C_{27} H_{45} Br_2 C_3 H_5 O_2$.

Zur Darstellung des Dibromcholesterylpropionats wird das völlig reine Cholesterylpropionat in wenig reinem Schwefelkohlenstoff gelöst und unter Abkühlung durch kaltes Wasser so lange eine Auflösung von Brom in Schwefelkohlenstoff eingetragen, bis sich eine bleibende Gelbrotfärbung bemerkbar macht. Die Bromierung muss ganz langsam vorgenommen werden, und man setzt neue Bromlösung erst zu, wenn vollständige Entfärbung eingetreten ist. Während

---

[21]) Wiener Monatshefte 5 (1888), 432.

der Einwirkung konnte ich keine Entwickelung von Bromwasserstoff bemerken, ein Beweis, dass ein Additionsprodukt entsteht. Lässt man nun die gelbrote Flüssigkeit bei gewöhnlicher Temperatur verdunsten, so hinterbleibt eine harzige, spröde, hellgelbe Masse, welche fein zerrieben werden kann. Es ist darin noch etwas Bromwasserstoff vorhanden, welcher, wie beim Cholesterinbromid, sich beim Eindunsten durch teilweise Zersetzung des ursprünglichen Bromadditionsproduktes bildete; man entfernt denselben durch Auswaschen mit Wasser und trocknet die Masse im luftverdünnten Raum über concentrierter Schwefelsäure. Zur Reinigung löst man dieselbe in möglichst wenig Äther und fällt sie mit wenig Alkohol aus. Durch wiederholtes langsames Auskrystallisieren aus Äther, dem man etwas Alkohol zugesetzt hat, erhält man die Verbindung in rechteckigen Blättchen oder auch in Nadeln, je nach der Schnelligkeit der Verdunstung.

Die Verbindung zeigt Dimorphismus, wie auch Reinitzer (l. c.) beim Dibromcholesterylacetat zu beobachten Gelegenheit hatte; die beiden Krystallformen sind mit blossem Auge leicht zu erkennen.

Der Schmelzpunkt der Verbindung liegt bei 110°, die Schmelze färbt sich leicht gelblich; nach dem Erkalten bleibt sie glasartig und kann nicht mehr zur Krystallisation gebracht werden. Bei noch höherer Temperatur entweichen Bromdämpfe. Die Verbindung scheint auch etwas lichtempfindlich zu sein, nach 8 Wochen zeigten die in einem Röhrchen mit luftdicht schliessendem Glasstöpsel aufbewahrten Krystalle eine hellrote Färbung, dem Licht nicht ausgesetzt blieben sie weiss.

Lässt man Wasserstoff in statu nascendi auf die Verbindung einwirken, so wird das Brom entfernt. Der Versuch kann in der Weise angestellt werden, dass man die Bromverbindung in Äther löst, etwas wasserhaltigen Alkohol und Natriumamalgam zugiebt.

Im Natriumalkoholat hat man ein bequemes Mittel, um nachzuweisen, an welcher Stelle in der Molekel das Brom sich angelagert hat. Versetzt man die ätherische Lösung mit Natriumalkoholat, so entsteht propionsaures Natrium, welches sich aus der ätherischen Flüssigkeit niederschlägt, und im Äther bleibt Dibromcholesterin. Dunstet man ab und schmilzt den Rückstand mit Soda und Salpeter, so giebt die Schmelze starke Bromreaktion, während das Natriumpropionat sich als bromfrei erweist. Hierdurch ist bewiesen, dass das Brom nur in die Molekel des Cholesterins eingetreten ist, wie

ja auch das Nichtauftreten von Bromwasserstoffdämpfen bei der Bromierung diesen Verlauf der Reaktion andeutete.

Zur Analyse der Verbindung verfuhr ich nach der von Reinitzer (l. c.) angegebenen Methode. Die über Schwefelsäure getrocknete Substanz wurde in Ätheralkohol gelöst, mit so viel Wasser versetzt, dass noch keine Trübung entstand und dann Natriumamalgam eingetragen. Nach 12stündigem Stehen wurde abfiltriert, mit heissem Wasser nachgewaschen und im Filtrat das Brom durch Silberlösung gefällt. Eine zweite Brombestimmung machte ich nach der Methode von Carius.

Analysen:

I. 0,3452 g Substanz lieferten 0,2154 g Ag Br (nach Reinitzer).
II. 0,4623 g Substanz lieferten 0,2883 g Ag Br (nach Carius).
III. 0,2103 g Substanz gaben 0,4605 g CO_2 und 0,1584 g H_2O.
IV. 0,2302 g Substanz gaben 0,5038 g CO_2 und 0,1737 g H_2O.

Berechnet für:		Gefunden:			
$C_{26}H_{43}Br_2C_3H_5O_2$	$C_{27}H_{45}Br_2C_3H_5O_2$	I	II	III	IV
C 59,18	59,80	—	—	59,68	59,68
H 8,16	8,30	—	—	8,36	8,38
Br 27,21	26,57	26,56	26,54	—	—

Die Analysen lassen die Formel $C_{27}H_{45}OH$ für das Cholesterin als die wahrscheinlichere vermuten.

Bernsteinsäure-dibromcholesterylester.

Diese Verbindung, welche den neutralen Dibromcholesterylester der Bernsteinsäure darstellt, lässt sich in der gleichen Weise herstellen, wie der bromierte Propionsäureester. Man löst den Bernsteinsäurecholesterylester in Schwefelkohlenstoff, und lässt in die Lösung unter fortwährendem Abkühlen Brom-Schwefelkohlenstoff eintröpfeln, bis keine Entfärbung mehr stattfindet. Hierbei zeigt sich ebenfalls keine Entwickelung von Bromwasserstoff. Zur Reindarstellung der Verbindung wird in derselben Weise verfahren, wie bei der vorhergehenden.

Auch dieser Körper ist in Äther schwer, in Alkohol unlöslich, leicht löslich in Schwefelkohlenstoff und Chloroform. Er krystallisiert sehr schön in wohlausgebildeten, äusserst dünnen und stark irisierenden Blättchen. Sein Schmelzpunkt liegt bei 164°; über diese Temperatur erhitzt, zersetzt er sich unter heftiger Entwickelung von

Bromdämpfen. Dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt, verändert er sich ähnlich wie das Propionat.

Da sich bei seiner Darstellung kein Bromwasserstoff entwickelt und er durch Natriumalkoholat die gleiche Zersetzung erleidet, wie das Bromcholesterylpropionat, so ist er ebenfalls als ein Bromadditionsprodukt des Bernsteinsäurecholesterylesters zu betrachten.

Analysen:

I. 0,3213 g Substanz lieferten 0,2051 g Ag Br (nach Reinitzer).
II. 0,4513 g Substanz lieferten 0,2885 g Ag Br.
III. 0,2123 g Substanz lieferten 0,4607 g CO_2 und 0,1549 g H_2O.
IV. 0,2234 g Substanz lieferten 0,4851 g CO_2 und 0,1639 g H_2O.

	Berechnet für:		Gefunden:			
$C_2H_4 <$	$COO\,C_{26}H_{43}Br_2$ / $COO\,C_{26}H_{43}Br_2$	$C_2H_4 <$	$COO\,C_{27}H_{45}Br_2$ / $COO\,C_{27}H_{45}Br_2$	I	II	III	IV
C	58,63		59,28	—	—	59,11	59,23
H	7,85		8,00	—	—	8,10	8,18
Br	27,92		27,25	27,17	27,21	—	—

Bromierte Cholesterylester aromatischer Säuren.

Bei der Bromierung der Cholesterylester aromatischer Säuren tritt das Brom nicht an das Cholesterin, sondern an den Benzolkern. Hierin unterscheidet sich dieser Prozess also wesentlich von der Bromierung von Fettsäurecholesterylestern.

Monobrombenzoësäurecholesterylester.

$C_6H_4Br \cdot COOC_{27}H_{45}$.

Diese in grossen seideglänzenden Nadeln krystallisierende Verbindung wird ähnlich den vorhergehenden Bromverbindungen dargestellt. Man löst den Benzoësäurecholesterylester in nicht zu wenig Schwefelkohlenstoff, und lässt unter guter Abkühlung langsam Brom, welches in Schwefelkohlenstoff gelöst ist, zufliessen, so lange, bis sich die braungelbe Flüssigkeit beim Umschütteln nicht mehr entfärbt. Während dieser Operation entwickelt sich Bromwasserstoff in grossen Mengen. Nach Beendigung der Reaktion wird der Schwefelkohlenstoff verdunstet; der Rückstand bildet eine harzartige Masse, die durch überschüssiges Brom braunrot gefärbt ist. Beim Zerreiben verschwindet diese Färbung, indem das Brom verdunstet. Nach dem Auswaschen mit Wasser und Trocknen über Schwefel-

säure im evacuierten Exsiccator lässt sich dieser Ester ebenso wie die frühern Verbindungen rein darstellen.

Wird der Ester in Ätheralkohol, dem etwas Wasser zugesetzt ist, mit Natriumamalgam behandelt, so erhält man kein Bromnatrium. Lässt man Natriumalkoholat auf denselben einwirken, so findet eine Spaltung in brombenzoësaures Natron und Cholesterin statt. Beide Vorgänge liefern in Gemeinschaft mit der Thatsache der Bromwasserstoffentwickelung bei der Bromierung den Beweis, dass hier das Brom in das aromatische Säureradikal eingetreten ist, d. h. an den Benzolkern, so dass hier ein Substitutionsprodukt vorliegt.

Der Schmelzpunkt des Esters liegt bei 136°; einige Grade über diese Temperatur erhitzt, entwickelt er Bromdämpfe. Er ist leicht löslich in Äther, Chloroform, Schwefelkohlenstoff. Gegen Licht ist er im Gegensatz zu den bromierten Cholesterylestern der Fettsäuren ganz unempfindlich. Rasch erhitzt verpufft er. Nach dem vorsichtigen Schmelzen lassen sich aus der Masse durch Umkrystallisieren aus Ätheralkohol die grossen, seidenglänzenden Krystallnadeln wiederherstellen.

Analysen:

I. 0,3562 g Substanz lieferten 0,1177 g Ag Br.
II. 0,4721 g Substanz lieferten 0,1558 g Ag Br.
III. 0,2103 g Substanz lieferten 0,5526 g CO_2 und 0,1638 g H_2O.
IV. 0,2202 g Substanz lieferten 0,5786 g CO_2 und 0,1719 g H_2O.

Berechnet für:		Gefunden:			
$C_7H_4BrO_2C_{26}H_{43}$	$C_7H_4BrO_2C_{27}H_{45}$	I	II	III	IV
C 71,35	71,70	—	—	71,65	71,66
H 8,46	8,61	—	—	8,65	8,67
Br 14,41	14,06	14,06	14,04	—	—

(Die Brombestimmungen wurden nach der Methode von Carius ausgeführt.)

Monobromphtalsäure-dicholesterylester.

In gleicher Weise wie beim Cholesterylbenzoat erhält man durch Bromieren des Phtalsäuredicholesterylesters den Monobromphtalsäuredicholesterylester. Die Bromierung geht hierbei etwas schneller von statten, jedoch ist die Ausbeute geringer. Während man beim Benzoat 85 % Ausbeute erhält, beträgt dieselbe hier nur 65 %. Das Auftreten von Bromwasserstoff zeigt deutlich, dass eine Substitution

stattfindet. Die Reindarstellung dieses Körpers lässt sich durch mehrmaliges Umkrystallisieren aus Äther, dem etwas Alkohol zugefügt ist, leicht bewerkstelligen. Sein Schmelzpunkt liegt bei 156°. Bei dieser Temperatur zersetzt er sich langsam unter Entwickelung von Bromdämpfen. Schon bei 160° tritt diese Zersetzung momentan ein. In die Flamme eines Bunsenbrenners gebracht, verpufft auch dieser Körper. Leicht löslich in Chloroform und Schwefelkohlenstoff, wird der Ester von Äther ziemlich schwer aufgenommen und ist in Alkohol nahezu unlöslich. Aus Ätheralkohol krystallisiert er in Nädelchen, die bereits bei schwacher Vergrösserung sich sehr deutlich erkennen lassen.

Natriumalkoholat spaltet ihn analog wie den Brombenzoësäureester, wodurch wiederum ein Beweis für die Stellung des Broms in der Molekel geliefert wird.

Analysen:

I. 0,4215 g Substanz gaben 0,0803 g Ag Br.
II. 0,4623 g Substanz gaben 0,0879 g Ag Br.
III. 0,2213 g Substanz gaben 0,6149 g CO_2 und 0,1899 g H_2O.
IV. 0,2133 g Substanz gaben 0,5925 g CO_2 und 0,1831 g H_2O.

	Berechnet für:		Gefunden:			
$C_6H_3Br <$	$COOC_{26}H_{43}$ / $COOC_{26}H_{43}$	$C_6H_3Br <$	$COOC_{27}H_{45}$ / $COOC_{27}H_{45}$	I	II	III	IV
C	75,55		75,84	—	—	75,77	75,71
H	9,33		9,48	—	—	9,53	9,51
Br	8,39		8,15	8,11	8,09	—	—

Die Ergebnisse der Analysen des Brombenzoësäure- und Bromphtalsäureesters lassen wiederum mit grosser Sicherheit auf die Formel $C_{27}H_{45}OH$ für das Cholesterin schliessen.

An dieser Stelle möchte ich noch summarisch darauf hinweisen, dass es eine allen Bromcholesterylverbindungen gemeinsame Eigentümlichkeit ist, bei längerem Kochen mit Alkohol zersetzt zu werden.

Cholesteryläther.

So leicht, vom theoretischen Standpunkte aus betrachtet, die Herstellung des einfachen und der gemischten Äther des Cholesterins ausführbar erscheint, so verliefen doch die zahlreichen Versuche, welche ich in dieser Richtung anstellte, resultatlos. Man sollte annehmen, dass das Natriumcholesterylat sich mit Äthyljodid

in der Weise umsetzt, dass sich Jodnatrium und Cholesteryläthyläther bilden, und dies um so mehr, als ja das Natriumcholesterylat keine allzu beständige Verbindung ist. Alle Versuche, welche ich mit Cholesterinnatrium und Jodmethyl, Jodäthyl und Jodamyl anstellte, ergaben, dass das Cholesterinnatrium zum grössten Teil unzersetzt blieb.

In einem gut getrockneten Glasrohr brachte ich beide Verbindungen, in Chloroform gelöst, zusammen, zuerst bei einer Temperatur von 110° im Schiessofen etwa 2 Stunden, dann 4 Stunden; alsdann erhöhte ich die Temperatur auf 120° und erhitzte wieder bis zu 4 Stunden. Es war in keinem Fall eine Umsetzung zu constatieren, immer blieb Cholesterinnatrium zurück. Es ist wohl möglich, dass die unvollständige Löslichkeit des Cholesterinnatriums in Chloroform die Ätherbildung verhindert. Walitzky[22]) will nun festgestellt haben, dass das Natriumcholesterylat beim Erhitzen auf 100° im geschlossenen Rohr mit Äthyljodid überhaupt keinen gemischten Cholesteryläther giebt, wie man erwarten sollte, sondern den aus Äther in Tafeln krystallisierenden Dicholesteryläther $\begin{matrix} C_{26}H_{43} \\ C_{26}H_{43} \end{matrix}\!>\!O$, vom Schmelzpunkt 141°. Ich kann nur anführen, dass mir die Bestätigung dieser Angabe nicht geglückt ist.

Die Versuche, welche ich mit Cholesterylchlorid und Cholesterinnatrium zur Darstellung dieses Äthers ausführte, waren ebenfalls erfolglos.

Eigentümlich sind nach Walitzky (l. c.) die Umwandlungen des Cholesterylchlorids. Erhitzt man diesen Körper mit Natriumalkoholat, so entsteht daraus ein höherer Kohlenwasserstoff von der Formel $C_{26}H_{42}$, welche Verbindung nichts Anderes ist, als das schon von Zwenger[23]) dargestellte Cholesterylen. Beim Kochen mit Natriumamalgam und Alkohol verwandelt dasselbe sich in das Hydrocholesterylen $C_{26}H_{44}$ (Walitzky[24])).

Durch die Amidogruppe lässt sich dagegen das Chloratom im Cholesterylchlorid ganz regelrecht ersetzen. Nach der allbekannten Methode, die wir A. W. v. Hofmann verdanken[25]), hat bereits

[22]) Journ. d. russ. phys.-chem. Ges. 8, 235.

[23]) Ann. Chem. Pharm. 66, 5 u. 69, 347.

[24]) Journ. d. russ. phys.-chem. Ges. 8, 237.

[25]) Ann. Chem. Pharm. 79, 16.

[26]) Ber. d. d. chem. Ges. 5, 513.

Löbisch[26]) aus Cholesterylchlorid und Ammoniak das Cholesterylamin hergestellt, einen gut krystallisierenden Körper, der bei 101° schmilzt.

Walitzky[27]) wandte infolgedessen substituierte Ammoniake an und erhielt bei der Einwirkung von Anilin auf Cholesterylchlorid bei 180° das in grossen Tafeln krystallisierende Cholesterylanilin vom Schmelzpunkt 187°, sowie bei der Einwirkung von p-Toluidin das ebenfalls in rechtwinkligen Tafeln krystallisierende Cholesteryl-p-toluidin vom Schmelzpunkt 172°.

Während das Cholesterylamin beim Erkalten schöne bläulich-violette Farbenerscheinungen zeigt (Löbisch[27]), konnte ich bei diesen substituierten Cholesterylaminen keine Farben beobachten.

Bemerken möchte ich hier noch, dass der Darstellungsprozess dieser Amine äusserst glatt und nahezu quantitativ verläuft.

Nach diesen Erörterungen über das Cholesterylchlorid, welche ich glaubte hier anfügen zu sollen, möchte ich noch auf eine Verbindung zu sprechen kommen, welche man als einen Äther des Cholesterins ansehen muss. Es gelang mir, durch Einwirkung von Benzylchlorid auf Cholesterinnatrium den Benzyläther des Cholesterins darzustellen.

Cholesterylbenzyläther.

$$\begin{matrix} C_6H_5 \cdot CH_2 \\ C_{27}H_{45} \end{matrix} > O.$$

Dieser Äther wird durch 12 stündiges Erhitzen von reinem Cholesterinnatrium und wasserfreiem Benzylchlorid unter Zusatz von Chloroform oder Steinöl im vollständig trockenen geschlossenen Rohr bei 100° erhalten. Nach dem Öffnen des Rohrs wird der Inhalt mit Äther ausgezogen und filtriert. Auf dem Filter bleibt ein kleiner Teil einer harzig aussehenden Masse zurück, welche Chlornatrium enthält. Bei langsamem Verdunsten des ätherischen Filtrats scheiden sich eigentümlich knollig gruppierte, dünne Blättchen aus. Die Krystalle sind etwas milchig getrübt und schmelzen bei 78°.

Analysen:

I. 0,2301 g Substanz gaben 0,7230 g CO_2 und 0.2268 g H_2O.

II. 0,2202 g Substanz gaben 0,6915 g CO_2 und 0.2169 g H_2O.

[27]) Journ. d. russ. phys.-chem. Ges. 10, 355.

	Berechnet für:		Gefunden:	
$\frac{C_6H_5 \cdot CH_2}{C_{26}H_{43}} > O$		$\frac{C_6H_5 \cdot CH_2}{C_{27}H_{45}} > O$	I	II
C	85,34	85,71	85,66	85,60
H	10,84	10,92	10,95	10,94

Bevor ich dazu übergehe, aus den oben gewonnenen Resultaten theoretische Schlüsse zu ziehen auf die Constitution des Cholesterins, möchte ich zunächst noch meine Versuche über das Isocholesterin bringen, und an der Hand der gesamten Resultate einen Vergleich der beiden Körper durchführen.

II. Isocholesterin.

Es sei mir zunächst gestattet, über diejenige Substanz einige Mitteilungen zu machen, welche das Ausgangsmaterial für die Darstellung des Isocholesterins liefert. Diese Substanz bildet ein eigentümliches Fett, das sich aus den Hautdrüsen mehrerer Tiere absondert. Die Secretion dieser fettigen Substanz tritt nirgends auffallender zutage, als bei den Wollhaaren der Schafe, bei welchen sie in reichlicher Menge stattfindet. Betrachtet man die rohe Wolle, wie sie nach der Schafschur auf den Markt gebracht wird, so lassen sich mit Leichtigkeit beträchtliche Quantitäten von Fettsubstanz daran feststellen.

Die ersten chemischen Untersuchungen dieser als Wollfett oder Wollschweiss bekannten Substanz rühren von Vauquelin[1]) her, welcher zuerst die Eigenart dieses Fettes constatierte. Die Resultate seiner Versuche, die von der feinen Beobachtungsgabe des grossen Forschers zeugen, und die durch die spätern Arbeiten bis auf die heutige Zeit fast ganz bestätigt werden konnten, mögen in folgenden Sätzen zusammengefasst werden. Vauquelin fand:

1. *D'un savon à base de potasse, qui en fait la plus grande partie;*
2. *D'une petite quantité de carbonate de potasse;*
3. *D'une quantité notable d'acétate de potasse;*

[1]) Ann. chim. phys. 47, 276.

4. *De chaux à un état de combinaison inconnu;*
5. *D'un „atome" de muriate de potasse;*
6. *D'une matière animale, à laquelle est attribuée l'odeur particulière du suint.*

Der grosse Gehalt an Kalisalzen, den Vauquelin erwähnt, hat früher zu einer eigenen Pottasche-Industrie geführt, die in Frankreich bis auf den heutigen Tag, wo das Wollfett anderweitige Verwendung gefunden hat, in Blüte stand.

Erst lange nach Vauquelin wurden die Untersuchungen über diesen Körper wieder aufgenommen. Hartmann[2]) präcisierte, wie schon oben kurz erwähnt, die Eigentümlichkeiten des Fettes genauer, indem er feststellte, dass es kein Glycerin enthält, und dass durch seine Zerlegung mit alkoholischer Kalilauge eine Substanz erhalten wird, welche die Reaktionen des Cholesterins giebt. Das gleichzeitige Vorkommen von Fettsäuren liess ihn vermuten, dass das Cholesterin an dieselben gebunden, als Ester im Wollfett enthalten sei. Stearinsäure und Ölsäure hatten ausser ihm auch Ulbricht und Reich[3]) darin genau nachgewiesen.

Die Vermutungen, welche Hartmann betreffs der Art des Vorkommens des Cholesterins im Wollfett aussprach, fanden durch die Arbeiten von Schulze[4]) ihre volle Bestätigung. Letzterer erkannte darin einen wesentlichen Bestandteil des Wollfettes und entdeckte neben dem Cholesterin einen zweiten demselben ähnlichen Körper, welchen er Isocholesterin nannte.

Schulze verfährt im wesentlichen folgendermassen: Er digeriert das Wollfett mit heissem Alkohol, wobei der grösste Teil ungelöst zurückbleibt, während 10 bis 15 % in den Alkohol übergehen. Aus dem in Alkohol löslichen Teil konnte er durch Verdunstung Cholesterinkrystalle erhalten und stellte dadurch das freie Vorkommen desselben fest. Bei der Verseifung mit alkoholischem Kali lieferte ihm dieser Teil viel Cholesterin, daneben eine kleine Menge einer aus alkoholischer Lösung in weissen Flocken sich ausscheidenden Substanz. Der in Alkohol unlösliche Teil lieferte bei seiner Verseifung eine grössere Menge dieser flockigen Substanz, gemischt mit krystallinischen Blättchen von Cholesterin. Die Flocken von den

[2]) Inaugural-Diss., Göttingen 1868.
[3]) Annal. d. Landw. 49, 122.
[4]) Ber. d. d. chem. Ges. 5, 1077; 6, 251. Journ. f. pr. Chem. 108, 194.

Blättchen mechanisch zu trennen, war unmöglich; er vermutete, in dem flockigen Körper ein isomeres Cholesterin gefunden zu haben und versuchte, auf dem Wege der Benzoylierung beide zu trennen. So erhielt er ein Gemenge von grossen Krystalltafeln, den schon bekannten Benzoësäurecholesterylester, und von feinen Nadeln. Letztere trennte er durch Schlämmen ab, verseifte sie mit alkoholischem Kali und erhielt so wieder den flockig auskrystallisierenden Körper, der sich dem Cholesterin ähnlich erwies und gleiches Molekulargewicht zeigte, das Isocholesterin.

Nach diesen Untersuchungen besteht das Wollfett neben 30% freien Fettsäuren, färbenden und riechenden Verunreinigungen im wesentlichen aus freiem Cholesterin und esterartigen Verbindungen des Cholesterins und Isocholesterins. Gerade dieser Gehalt an Fettsäurecholesteryl- und -isocholesterylestern ist es, welcher die schwere Verseifbarkeit des Wollfettes bedingt, und zugleich ihm die Eigenschaft verleiht, nicht ranzig zu werden, was ja bekanntlich mit der Verseifung im engsten Zusammenhange steht.

In der letzten Zeit ist es Liebreich gelungen, diese Cholesterylfettsäureester aus dem Wollfett zu isolieren. Das Verfahren hat technische Anwendung in der Darstellung des Lanolins gefunden, welches im wesentlichen aus diesen Estern besteht.

Was nun speziell die Gewinnung des Isocholesterins anbelangt, so setzt man nach Schulze das Wollfett zur Verseifung unter Druck 24 Stunden lang der Einwirkung einer möglichst concentrierten alkoholischen Kalilauge aus. Die gebildeten Seifen werden in Wasser gelöst und die Lösung mit Äther mehrmals extrahiert. Nach dem Abdestillieren des Äthers erhielt Schulze eine gelbe wachsartige Masse.

Bei der Wiederholung dieses Versuchs, bei der ich mich genau an die gegebene Vorschrift hielt, gelang es mir, nur geringe Quantitäten dieser gelben Masse zu erhalten. Die Hauptmenge derselben blieb als milchige Trübung in der Seifenlösung und war trotz wiederholter Erneuerung des Äthers nicht zu entfernen. Nach vielen vergeblichen Versuchen kam ich zu folgender Methode: die verseifte Masse wurde in Alkohol gelöst und die alkoholische Flüssigkeit mit viel Äther versetzt, wodurch der grösste Teil der Seifen ausfiel. Nachdem diese nun durch Filtration beseitigt waren, wurde die alkoholisch-ätherische Lösung im Scheidetrichter mit aller Vorsicht, um Emulsionen zu vermeiden, mit Wasser ausgeschüttelt. Nach dem

Abdestillieren blieb eine grössere Quantität der gelben Masse zurück, die indes noch Seife enthielt, welche durch weitere Reinigung nicht zu entfernen war, und daher fest mit ihr verbunden zu sein scheint.

Das Gewicht des so erhaltenen Rückstandes betrug ungefähr $^1/_4$ des angewandten Wollfettes, wovon noch mindestens 5 % wegen des Seifengehaltes in Abzug zu bringen sind.

Eine weit grössere Ausbeute an gelber Masse, zugleich vollständig seifenfrei, erhielt ich nun dadurch, dass ich zur Verseifung des Wollfettes Natriumalkoholat anwandte. Die Methode (Kossel und Obermüller[5]) wird in der Art ausgeführt, dass man das Fett in Äther löst, zu der ätherischen Lösung Natriumalkoholat zugiebt, wodurch die Verseifung in überraschend einfacher und bequemer Weise auszuführen ist. Bereits nach kurzer Zeit bildet sich ein Niederschlag, welcher, wie ich später zeigen werde, aus Natronseifen besteht. Sobald nur die Menge des Natriumalkoholats eine genügende ist, ist die Verseifung in kurzer Zeit bei gewöhnlicher Temperatur beendet. Die Seife scheidet sich in Form eines leicht filtrierbaren Niederschlages aus, der auch bequem abgesogen oder ausgepresst werden kann. Hierdurch unterscheidet sich dieser Prozess sehr zu seinem Vorteil von dem durch Natronlauge bewirkten. Nur in dem Falle, dass das angewandte Fett harzartige Verunreinigungen enthält (wie z. B. das rohe Wollfett), ferner, wenn die Verseifung infolge eines ungenügenden Zusatzes von Natriumalkoholat keine vollständige ist, macht das Filtrieren oder Absaugen Schwierigkeiten. — Wegen der leichten Filtrierbarkeit des Niederschlages bietet sich die Möglichkeit, alle in dem Äther gelösten Bestandteile mit Leichtigkeit von der Seife zu trennen.

In gewissen Fällen kann diese Verseifungsmethode auch dazu Verwendung finden, die Frage, ob eine Substanz ein Ester sei oder nicht, zu entscheiden, z. B. lässt sich sehr leicht zeigen, dass das Lecithin durch Einwirkung von Natriumalkoholat schon in der Kälte eine Zersetzung erleidet. So gelang es mir, aus Eigelb Cholesterin mit grosser Leichtigkeit und Schnelligkeit zu isolieren.

Bei der nun zu beschreibenden Darstellung des Isocholesterins verwandte ich als Ausgangsmaterial nicht das Wollfett, sondern das nach Liebreich hergestellte Lanolin, welches als ein gereinigtes Wollfett zu betrachten ist und verfuhr wie folgt:

[5]) Zeitsch. f. physiol. Chem. 14, Heft 6.

1 kg Lanolin wird in einem 10 l fassenden Rundkolben in 4½ bis 5 l Äther gelöst (am besten wird das Lanolin hierbei im geschmolzenen Zustande portionenweise eingetragen). In diese ätherische Lösung werden 3 l Natriumalkoholatflüssigkeit allmählich unter fortwährendem Umschütteln eingetragen. Der Gehalt derselben an Natrium betrug 300 g; nach mehreren Versuchen ergab sich nämlich, dass die richtige Quantität Natrium zur Verseifung von 10 g Lanolin ungefähr 3 g beträgt, welche man, um die nötige Concentration der Verseifungsflüssigkeit zu haben, in 25 bis 30 cc 96%igen Alkohols lösen muss. Je mehr Alkoholat man allmählich zusetzt, desto stärker wird der Seifenniederschlag. Das Ganze lässt man nun 2 bis 3 Tage stehen, damit sich die Seife recht gut abscheidet; sie hat dann ein gelbes, sandiges Aussehen und man kann die darüberstehende, rotgelb gefärbte ätherische Lösung vorsichtig abgiessen. Alsdann wird zur Seife neuer Äther hinzugefügt und durchgeschüttelt, nach kurzem Stehen mittels der Wasserstrahlluftpumpe abgesogen, die Seifen noch ätherfeucht unter Zusatz von wenig Alkohol in Filtrierpapier gebracht, dann in starke Filtrierleinwand gehüllt und unter einer Spindelpresse bis zur Trockne ausgepresst. Der Presskuchen muss sich klar in Wasser lösen, zum Beweis, dass eine vollständige Verseifung stattgefunden hat und durch gehöriges Auswaschen mit Äther alle in demselben löslichen Substanzen entfernt worden sind.

Die verschiedenen Ätherlösungen werden nun zusammengethan und zur Entfernung ihres geringen Seifengehalts vorsichtig mit Wasser im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Bei dem ersten Wasserzusatz muss man, um eine Emulsion zu verhüten, ganz langsam umschwenken. Die grösste Menge der sehr leicht löslichen Lanolinseife geht schon hierbei in das Wasser über; beim dritten Wasserzusatz kann man ohne Nachteil sehr stark durchschütteln.

Die ätherische Flüssigkeit lässt man nun einige Zeit stehen, filtriert sie dann und destilliert das Lösungsmittel ab; im Rückstande bleibt eine hellgelbe, wachsartige Masse, welche bald erstarrt und dann einen muscheligen Bruch besitzt. Ihr Gewicht beträgt nahezu 350 g. Die Ausbeute an gelber Masse aus dem Lanolin beträgt also 35 %. Sie enthält kaum noch Spuren von Seifen.

Diese gelbe Masse behandelte ich nun nicht mit Benzoësäure, wie Schulze, sondern mit Benzoylchlorid, und verfuhr genau so, wie bei der oben bereits beschriebenen Darstellung des Cholesterylbenzoats. Die Einwirkung des Benzoylchlorids erfolgt bei 140° unter

starkem Aufschäumen, verursacht durch die sich entwickelnden Salzsäuredämpfe. Um diese zu verjagen und dadurch ihre zersetzende Wirkung auf die Schmelze möglichst abzuschwächen, leitete ich in dieselbe einen trockenen Luftstrom. Nachdem die Salzsäureentwickelung aufgehört hat, lässt man die Schmelze abkühlen, versetzt sie mit Ätheralkohol und kocht bei aufgesetztem Rückflusskühler längere Zeit, um die beim Schmelzen gebildeten Schmieren in Lösung zu bringen. Beim Erkalten bleibt eine weisse krystallinische Masse zurück, welche unter dem Mikroskop betrachtet aus quadratischen Täfelchen und Nadeln besteht. Das Krystallgemenge wird nun abgesaugt und mit Ätheralkohol ausgewaschen. Wie schon oben erwähnt, kann man die beiden darin enthaltenen Benzoësäureester durch Schlämmen von einander trennen, da das Isocholesterylbenzoat zarte Krystallnädelchen bildet, während das Cholesterylbenzoat mehrere Millimeter grosse Krystalle liefert. Es liegt auf der Hand, dass der Schlämmprozess um so genauer durchgeführt werden kann, je grösser die Cholesterylbenzoatkrystalle ausfallen. In dieser Richtung stellte ich mehrere Versuche an, und es eignet sich wohl folgendes Verfahren zu dem Zwecke am besten. Man löst das Krystallgemenge in siedendem Äther, dem etwas absoluter Alkohol beigemengt wird; beim Erkalten der Lösung scheiden sich nach etwa 15 Minuten schillernde Täfelchen aus. Sobald die Ausscheidung beginnt, erhitzt man wieder, und wenn die Täfelchen verschwunden sind, giebt man zur warmen Lösung noch 150 bis 200 cc Äther. Man hat jetzt die richtige Concentration. Man bringt die Flüssigkeit in einen Rundkolben mit nicht zu weitem Halse und lässt sie langsam verdunsten. Nach 4 bis 5 tägigem Stehen setzt sich am Boden des Kolbens eine schöne Krystallkruste von grossen Cholesterylbenzoatkrystallen ab, mit Nadeln von Isocholesterylbenzoat bedeckt, die man nun durch Schlämmen sehr leicht abtrennen kann. In der Lösung befindet sich das Isocholesterylbenzoat mit wenig Cholesterylbenzoat. Man destilliert nun von der Lösung soviel ab, bis bei deren Erkalten ein allmähliches Ausscheiden von Täfelchen erfolgt, setzt alsdann wieder Äther hinzu und lässt langsam verdunsten. Aufs neue setzen sich am Boden des Kolbens grosse Tafeln von Cholesterylbenzoat ab, diesmal mit einer grössern Menge von Nadeln bedeckt, welche man wieder abschlämmt. Was jetzt noch sich in Lösung befindet, ist Isocholesterylbenzoat mit Spuren von Cholesterylbenzoat. Die Lösung wird

nun auf ein Viertel abdestilliert und die sich aus ihr ausscheidenden Krystallnadeln abgesaugt.

Das so erhaltene Isocholesterylbenzoat wird wieder in Äther gelöst und mit der berechneten Menge Natriumalkoholat verseift. Die ätherische Lösung wird filtriert (auf dem Filter bleibt benzoësaures Natron zurück), und mit Wasser zweimal ausgeschüttelt; sie ist etwas gelb gefärbt, diese Farbe (die öfter bei der Verseifung mit Natriumalkoholat sich bemerklich macht) wird durch einfaches Aufkochen mit Tierkohle entfernt. Nach dem Abdestillieren des Äthers bleibt das Isocholesterin als weisse flockige Masse zurück.

Das Produkt zeigte einen Schmelzpunkt von 137° (Schulze: 137/8°). Es enthielt aber doch noch Spuren von Cholesterin, wie sich bei der Darstellung von Propionsäureisocholesterylester herausstellte. Beim Zusammenschmelzen von Propionsäureanhydrid mit diesem Isocholesterin und nachherigen Erkalten der Schmelze zeigten sich nämlich stellenweise azurblaue Farben, was mich zu der Vermutung brachte, dass diese Farbenerscheinung nur durch Spuren von Cholesterin veranlasst sei und der Propionsäureisocholesterylester überhaupt keine Farbenerscheinungen zeige. Dies bestätigte sich bei der Behandlung desselben Isocholesterins mit Succinylchlorid. Beim Reinigen der hiermit erhaltenen Schmelze durch mehrmaliges Umkrystallisieren aus heissem Ätheralkohol erhielt ich schliesslich ein krystallinisches Pulver, welches sich bis auf einen kleinen Rückstand von feinen Nadeln in Äther löste. Letztere wurden von der Flüssigkeit getrennt und stimmten in der Krystallform wie im Schmelzpunkt genau mit dem (in Äther schwerlöslichen) Cholesterylsuccinat überein, sodass wohl kein Zweifel vorliegt, dass sie mit diesem identisch waren.

Das Succinylchlorid liefert also ein Mittel, um die letzten Spuren von Cholesterin aus dem Isocholesterin zu entfernen, und ich habe es zu diesem Zwecke auch auf die grössern von mir dargestellten Mengen Isocholesterin angewendet. Der dabei erhaltene völlig reine Isocholesterinbernsteinsäureester liefert durch Verseifung mit Natriumalkoholat ganz reines Isocholesterin.

Es lag die Frage nahe, ob nicht das verschiedene Verhalten des Cholesterins und des Isocholesterins gegen Succinylchlorid sich auch zur Trennung dieser Körper in der „gelben Masse“ verwerten liesse; ebenso, ob nicht auch die Phtalsäureverbindungen sich zu diesem Zweck eignen würden. Alle in dieser Richtung angestellten

Versuche verliefen jedoch resultatlos. Beim Zusammenschmelzen der gelben Masse mit Succinylchlorid erhielt ich eine gelbe Schmiere, aus welcher sich nichts isolieren liess; aus der Schmelze von Phtalsäureanhydrid mit der gelben Masse konnte ich allerdings die in Äther schwer löslichen Phtalsäureester isolieren, jedoch nur in unbedeutender Menge, im Äther blieb eine harzartige Masse gelöst, aus welcher nichts Krystallisierbares zu gewinnen war.

Was die mehrfach erwähnte „gelbe Masse" anbelangt, so besteht dieselbe nach Schulze zum grössten Teil aus einem Gemenge von Cholesterin und Isocholesterin; ich vermute, dass darin ungefähr gleiche Mengen von beiden enthalten sind, da ich aus Lanolin nahezu so viel Isocholesterylbenzoësäureester wie Cholesterylbenzoësäureester gewinnen konnte.

Die Masse zeigt überdies einen niedrigeren Schmelzpunkt als die beiden Cholesterine, was wir auch bei einem Gemenge der beiden Alkohole beobachten können.

Schulze vermutet in der Masse noch einen dritten Alkohol, weil die Analyse derselben nur einen Gehalt von 81,5 % Kohlenstoff ergab; bei einem Gemenge der beiden Cholesterine müsste der Prozentsatz allerdings höher sein.

Das reine Isocholesterin ist eine aus Äther und Aceton in feinen Nadeln krystallisierende Substanz; aus Alkohol scheidet es sich in amorpher Form ab, und zwar aus verdünnter Lösung in weissen Flocken, während eine concentrierte Lösung in heissem Alkohol beim Erkalten zu einer durchscheinenden Gallerte erstarrt. Sein Schmelzpunkt liegt nach Schulze bei 137—138°, nach meinen Beobachtungen bei 138,5°. Es ist im Gegensatz zum Cholesterin rechtsdrehend $[\alpha]_D = + 59{,}7^0$. Was seine Reaktionen in gelöstem Zustande anbelangt, so giebt es wie das Cholesterin die Reaktion mit Salpetersäure und Ammoniak, dagegen nicht diejenige mit Chloroform und Schwefelsäure[6]). (Schulze.) Eine andere Reaktion auf Isocholesterin wurde 1891 ebenfalls von Schulze[7]) angegeben, dieselbe wird ebenso angestellt wie die Liebermannsche Cholesterinreaktion, das Isocholesterin erteilt aber der Lösung zunächst gelbe, dann rotgelbe Farbe mit grüner Fluorescenz; dieselbe Reaktion lässt sich auch in Chloroformlösung ausführen (Burchard[8])).

[6]) Journ. f. pr. Chemie [2] 25, 459.

[7]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 1891, Bd. 14.

[8]) Inaug.-Dissert., Rostock 1889.

Isocholesterinkalium.

In der gleichen Weise, wie das Cholesterin an Stelle des Hydroxylwasserstoffs das Kalium aufnimmt, geschieht dies auch beim Isocholesterin. Die Darstellung der Verbindung ist daher auch eine ganz analoge. Unter lebhafter Wasserstoffentwickelung geht die Einwirkung von metallischem Kalium auf Isocholesterin vor sich. In Beziehung auf seine physikalischen und chemischen Eigenschaften steht die Verbindung dem Cholesterinkalium sehr nahe.

Analysen:

I. 0,2231 g Substanz lieferten 0,6220 g CO_2 und 0,2120 g H_2O.
II. 0,2321 g Substanz lieferten 0,6474 g CO_2 und 0,2196 g H_2O.

Berechnet für:		Gefunden:	
$C_{26}H_{43}OK$	$C_{27}H_{45}OK$	I	II
C 76,09	76,41	76,02	76,04
H 10,48	10,61	10,53	10,51

Isocholesterylpropionat.

$C_2H_5COOC_{26}H_{43}$.

Diese Verbindung kann in ganz gleicher Weise wie diejenige des Cholesterins dargestellt werden. Man schmilzt Isocholesterin mit Propionsäureanhydrid bei 100° zusammen, in wenigen Minuten ist die Esterbildung vor sich gegangen. Das Isocholesterinpropionat ist in Äther leicht, in Alkohol schwerer löslich, und kann in wohlausgebildeten Krystallen beim langsamen Verdunsten einer ätheralkoholischen Lösung erhalten werden. Es ist in physikalischer Beziehung sehr verschieden vom Cholesterylpropionat, sein Schmelzpunkt liegt bei 82°, seine Krystalle sind deutlich erkennbare, wohlausgebildete rhombische Blättchen von lebhaftem Fettglanz. Schmilzt man dieselben, so tritt beim Erkalten der Schmelze keinerlei Farbenerscheinung auf. Beim Bromieren wird die Verbindung zersetzt.

Analysen:

I. 0,2213 g Substanz lieferten 0,6594 g CO_2 und 0,2250 g H_2O.
II. 0,2322 g Substanz lieferten 0,6917 g CO_2 und 0,2351 g H_2O.

Berechnet für:		Gefunden:	
$C_2H_5COOC_{26}H_{43}$	$C_2H_5COOC_{27}H_{45}$	I	II
C 81,30	81,44	81,24	81,22
H 11,21	11,31	11,29	11,24

Isocholesterylbernsteinsäureester.

$$C_2H_4 < \begin{matrix} COOC_{26}H_{43} \\ COOC_{26}H_{43} \end{matrix}.$$

Die Darstellung dieses Esters ist schon oben bei der Methode zur Reindarstellung des Isocholesterins besprochen worden; ebenso ist seiner Löslichkeit in Äther und Alkohol dort bereits gedacht. Es ist hier noch sein Schmelzpunkt zu verzeichnen, welcher bei 162° liegt. Jedoch scheint bei dieser Temperatur die Verbindung sich zu zersetzen, da sich aus der glasigen Schmelze beim Lösen derselben in Ätheralkohol und langsamen Verdunsten der Lösung keine Krystalle mehr gewinnen lassen, wodurch allerdings aber auch nicht ausgeschlossen ist, dass die Verbindung in einer amorphen und einer krystallisierten Modifikation existiert. Die Krystalle sind feine, weisse, undurchsichtige Nadeln, welche nicht die langgestreckten rechteckigen Formen zeigen, wie der entsprechende Cholesterylester. Bei ihrem Erkalten aus dem Schmelzfluss giebt auch diese Verbindung keinerlei Farbenerscheinung; bei der Bromierung wird sie ebenfalls zersetzt.

Analysen:

I. 0,3212 g Substanz lieferten 0,9579 g CO_2 und 0.3161 g H_2O.

II. 0,2312 g Substanz lieferten 0,6886 g CO_2 und 0.2279 g H_2O.

Berechnet für:		Gefunden:	
$C_2H_4 < \begin{matrix} COOC_{26}H_{43} \\ COOC_{26}H_{43} \end{matrix}$	$C_2H_4 < \begin{matrix} COOC_{27}H_{45} \\ COOC_{27}H_{45} \end{matrix}$	I	II
C 81,37	81,49	81,32	81,22
H 10,89	11,00	10,92	10,94

Isocholesterindibromür.

$$C_{26}H_{43}OHBr_2.$$

Das Isocholesterin hat ebenfalls die Fähigkeit, zwei Atome Brom in seine Molekel aufzunehmen. Die Bromierung wird genau in der von Wislicenus und Moldenhauer[9]) angegebenen Weise ausgeführt; man muss jedoch hier mit sehr verdünnten Auflösungen von Brom in Schwefelkohlenstoff arbeiten, da sonst leicht eine Zersetzung eintritt, und auch fortwährend für gute Abkühlung Sorge tragen. Während des ganzen Prozesses ist keine Gasentwickelung bemerkbar, die erhaltene Verbindung erweist sich gemäss ihrer

[9]) Ann. Chem. Pharm. 146, 178.

Zerlegung durch Natriumamalgam und Analyse als ein Additionsprodukt von Isocholesterin mit Brom.

Sie schmilzt bei 108°, ist leicht löslich in Äther und krystallisiert daraus in langen Nädelchen, aus Schwefelkohlenstoff dagegen in dünnen Blättchen. Wird ihre ätherische Lösung mit Alkohol versetzt, so entsteht eine milchige Trübung, welche jedoch bei weiterem Zusatz wieder verschwindet. Beim Cholesterindibromür ist das Gegenteil der Fall, aus der ätherischen Lösung desselben fällt bei Zusatz von Alkohol sofort eine käsige Masse aus, deren Quantität bei weiterm Zusatz noch zunimmt und von überschüssigem Alkohol nicht gelöst wird; unter dem Mikroskop betrachtet, erwies dieselbe sich als aus ganz feinen, wohlausgebildeten Nadeln zusammengesetzt. Durch längeres Kochen mit Alkohol oder Eindunsten mit demselben unter Erwärmung werden beide Bromide zersetzt. Zur Analyse wurde die Substanz im Sauerstoffstrome mit Kupferoxyd verbrannt, unter Vorlegung einer Silberspirale; die Brombestimmung wurde nach Carius gemacht.

Analysen:

I. 0,3212 g Substanz lieferten 0,2289 g Ag Br.
II. 0,4213 g Substanz lieferten 0,2984 g Ag Br.
III. 0,2342 g Substanz lieferten 0,5030 g CO_2 und 0,1751 g H_2O.
IV. 0,2332 g Substanz lieferten 0,5009 g CO_2 und 0,1748 g H_2O.

Berechnet für:		Gefunden:			
$C_{26}H_{43}OHBr_2$	$C_{27}H_{45}OHBr_2$	I	II	III	IV
C 58,64	59,34	—	—	58,53	58,57
H 8,27	8,42	—	—	8,32	8,31
Br 30,00	29,30	30,32	30,14	—	—

Isocholesterylbenzoat.

Diese Verbindung ist schon von Schulze (l. c.) ausführlich beschrieben worden; ausser einer bestätigenden Analyse möchte ich nur hier mitteilen, dass ein Bromieren derselben sich wegen eintretender Zersetzung als unausführbar erweist. Im Interesse der Feststellung des Molekulargewichts glaube ich die Resultate meiner Analysen angeben zu müssen, umsomehr, als in dieser Verbindung ein besonders schön krystallisierter Körper von grosser Reinheit vorliegt.

Analysen:

I. 0,2113 g Substanz lieferten 0,6439 g CO_2 und 0,1931 g H_2O.
II. 0,2134 g Substanz lieferten 0,6506 g CO_2 und 0,1945 g H_2O.

Berechnet für:		Gefunden:	
$C_6H_5COOC_{26}H_{43}$	$C_6H_5COOC_{27}H_{45}$	I	II
C 83,19	83,26	83,10	83,13
H 10,08	10,20	10,12	10,12

Nach den Ergebnissen der Analyse der obigen Isocholesterinverbindungen dürfte für das Isocholesterin die Molekularformel $C_{26}H_{43}OH$ vorzuziehen sein.

Ich gehe nunmehr im Folgenden dazu über, auf Grund der erhaltenen Daten einen eingehenden Vergleich dieser beiden Alkohole durchzuführen.

Vergleich des Cholesterins mit dem Isocholesterin.

Die Verschiedenheit der Eigenschaften und Mannigfaltigkeit der Erscheinungen, welche die bis jetzt angestellten Untersuchungen beim Cholesterin und Isocholesterin ergeben haben, lässt eine genaue Charakteristik der beiden interessanten Alkohole zu.

Das Cholesterin ist von beiden das am weitesten verbreitete, es ist fast überall teils frei, teils gebunden an höhere Fettsäuren im gesamten Pflanzen- und Tierreiche anzutreffen. Es bildet einen wichtigen Bestandteil des Inhalts der Zellgewebe, es findet sich im Blute, in der Milch, im Eigelb. Das Vorkommen des Isocholesterin ist dagegen ein beschränktes. Es ist (wenigstens in beträchtlichen Mengen) bis jetzt allein im Wollfett aufgefunden worden. Jedoch kommt es, im Gegensatz zum Cholesterin, darin nicht im freien Zustande vor, sondern ist, wie ja auch ein Teil des Cholesterins, an höhere Fettsäuren gebunden.

Durch die bis jetzt vorliegenden Untersuchungen ist es als erwiesen zu betrachten, dass das Wollfett im Gegensatz zu andern Fetten an Stelle eines dreiwertigen Alkohols zwei einwertige, das Cholesterin und das Isocholesterin, enthält.

Cholesterin und Isocholesterin sind beide löslich in Äther und Alkohol; beide krystallisieren aus ersterem in Nadeln, das eine (Cholesterin) in grösseren, das andere (Isocholesterin) in feineren. Aus Alkohol jedoch erfolgt ihre Abscheidung in vollständig verschiedener Weise. Lässt man eine alkoholische Cholesterinlösung verdunsten, so scheiden sich aus derselben schöne, klinorhombische Tafeln ab, während das Isocholesterin amorphe, bald gallertartige, bald flockige Massen bildet.

Der Schmelzpunkt der beiden Cholesterine differiert um 7°, das Cholesterin schmilzt bei 145°, das Isocholesterin bei 138,5°.

Ihr Verhalten dem polarisierten Lichte gegenüber ist ein entgegengesetztes, das Cholesterin ist linksdrehend, $[\alpha]_D = -27°$, das Isocholesterin rechtsdrehend, $[\alpha]_D = +59{,}1°$.

In gelöstem Zustande geben beide verschiedene Farbenreaktionen. Bei der Liebermannschen Reaktion mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure tritt beim Cholesterin zuletzt eine blaue resp. blauviolette Farbe auf, beim Isocholesterin dagegen eine grünliche. Hingewiesen sei ferner auf die Isocholesterinreaktion von Schulze, deren bereits oben Erwähnung gethan wurde.

Sehr scharf können die beiden Cholesterine mittels Succinylchlorid von einander unterschieden werden; beim Kochen mit einem Überschuss desselben giebt Cholesterin beim Erkalten der Lösung eine lauchgrüne Farbe, Isocholesterin eine rosenrote.

Dagegen verhalten sich beide gleich bei der Behandlung mit Salpetersäure und Ammoniak.

Noch deutlicher zeigt sich die Verschiedenheit der beiden Cholesterine bei der Betrachtung ihrer Verbindungen. Bei ihrem Alkoholcharakter bilden sie gleich den Alkoholen der fetten und aromatischen Reihe mit ein- und mehrbasischen Fett- und aromatischen Säuren Ester, welche gut krystallisierte Verbindungen darstellen; und zwar konnte ich nur die Bildung neutraler Ester beobachten.

Die Cholesterylester zeichnen sich vor den Isocholesterylestern (mit Ausnahme des Isocholesterylpropionsäureesters) durch eine weit grössere Krystallisationsfähigkeit aus, welche ganz besonders bei den mehrere Millimeter grossen rhombischen Octaëdern des Benzoësäure-, den wohlausgebildeten schiefen Prismen des Phtalsäure- und den langen, aus rechtwinkligen Parallelepipeden bestehenden Nadeln des Bernsteinsäurecholesterylesters zu Tage tritt. Der Benzoësäureisocholesterylester bildet zarte Nadeln, der Bernsteinsäureisocholesterylester kurze, undurchsichtige Nadeln, welche unter dem Mikroskop als Prismen erscheinen. Nur der Propionsäureester des Isocholesterins macht insofern eine Ausnahme, als er in makroskopischen Quadrattafeln krystallisiert, welche starken Glanz zeigen, während die cholesterinähnlichen Blättchen des Cholesterylpropionats sich erst unter dem Mikroskop genau erkennen lassen.

Die Schmelzpunkte der Ester des Cholesterins und Isocholesterins

liegen weit auseinander: sie differieren um nahezu 40°. So schmilzt der Cholesterylbernsteinsäureester bei 210°, die entsprechende Isocholesterylverbindung bei 163/4°.

Sehr charakteristisch für die Cholesterylester ist es, dass sie sämtlich bei ihrem Erkalten aus dem Schmelzflusse prächtige Farbenerscheinungen zeigen, die teilweise ganz ausgeprägter Natur sind, wie dies oben beim Cholesterylpropionat ausführlich beschrieben ist. Hierher gehört auch die Chlorverbindung des Cholesterins, das in feinen Nadeln krystallisierende Cholesterylchlorid, das beim Erkalten aus dem Schmelzflusse eine schön azurblaue Farbe zeigt[10], welche sich mehrere Tage lang hält. Planer, Raymann[11]. Das Isocholesterylchlorid stellt nur eine gelbe, harzige Masse dar, welche beim Erkalten aus dem Schmelzflusse keinerlei Farben zeigt. Überhaupt scheinen sich die oben dargestellten Verbindungen des Isocholesterins beim Schmelzen mehr oder weniger zu zersetzen.

Was die Löslichkeit der beiden Arten von Cholesterylestern anbelangt, so ist dieselbe mit Ausnahme des Cholesterylacetats, des Propionats und Chlorides in Äther und Alkohol eine schwere. Nahezu unlöslich in Äther, dem etwas Alkohol zugesetzt worden, sind der Phtalsäurecholesterylester, Bernsteinsäurecholesterylester und Bernsteinsäurebromcholesterylester. Der Bernsteinsäureisocholesterylester ist dagegen leicht löslich in Ätheralkohol.

Beide Cholesterine haben die Eigenschaft gemein, auf eine Molekel zwei Atome Brom aufzunehmen. Die beiden Bromverbindungen unterscheiden sich aber sehr durch ihren Schmelzpunkt und ihre Löslichkeitsverhältnisse. Die Bromierung erstreckt sich beim Cholesterin auch auf dessen Ester, und zwar in der Weise, dass bei den Fettsäurecholesterylestern zwei Atome Brom an den Cholesterylrest treten, bei den aromatischen Säureestern aber ein Atom Brom in den aromatischen Kern eintritt. Auf die Ester des Isocholesterins wirkt dagegen das Brom zerstörend ein.

Sämtliche bromierte Cholesterinverbindungen und auch das Isocholesterindibromür werden bei längerem Kochen mit Alkohol zersetzt, unter Abscheidung gelber, harzartiger Massen. Die bromierten Cholesterylfettsäureester erleiden durch das Sonnenlicht eine Zersetzung.

[10]) Ann. Chem. Pharm. 118, 25.

[11]) Bull. de la soc. chim. de P. 47, 898.

Wie schon Berthelot[12] am Cholesterylstearin- und -palmitinsäureester nachgewiesen, gehört zu den charakteristischen Eigenschaften der Cholesterylester ihre schwere Verseifbarkeit durch Alkalien, eine Eigenschaft, die auch den Isocholesterylestern zukommt. Mittels Natriumalkoholat werden jedoch sämtliche Cholesteryl- und Isocholesterylester schnell und leicht verseift.

Im Anschluss an die vorstehenden Untersuchungen und Betrachtungen bleibt mir noch übrig, auf das oben mehrfach erwähnte Verseifungsverfahren näher einzugehen und die Vorgänge, welche sich bei diesem interessanten Prozess abspielen, zu beschreiben, umsomehr, als gerade dieses Verfahren mir die Mittel und Wege in die Hand gab, eine Darstellung von grösseren Quantitäten des Isocholesterins mit Erfolg auszuführen, und schliesslich auch einer genaueren Methode zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins in den Fetten auf die Spur zu kommen.

Das Verseifungsverfahren habe ich bei der Darstellung des Isocholesterins aus dem Lanolin skizziert. Über das Wesen dieses Prozesses war ich nun infolge der auffallenden Thatsache, dass bei demselben aus Glycerinfetten (so bei der Verseifung von Hammelfett, Rinderfett, Schweinefett) kein Glycerinäther, und ebenso bei der Verseifung des Wallrats kein Cetyläthyläther gebildet wird, wie man es erwarten sollte, lange im Unklaren, und meine volle Aufmerksamkeit richtete sich darauf, die Vorgänge bei dem Prozess klarzulegen.

Bei Ausführung des Versuches mit möglichst wenig Alkohol und grossen Mengen Äther geht ausser geringen Spuren von Seife kein anderer Körper in den von der Seife abfiltrierten Äther über, falls nicht das für die Verseifung angewandte Fett etwa in Äther lösliche Alkohole, Paraffine oder dergl. unverseifbare Substanzen enthält. Dagegen konnte bei den verschiedensten Fetten, wie Hammel- und Rindertalg, Schweinefett, Olivenöl, das Auftreten von Glycerin nachgewiesen werden, welches sich durch Auflösen der vom Äther befreiten Seifen in Wasser, Abscheiden der Fettsäuren mittels Salzsäure, Verdunstung der neutralisierten wässerigen Lösung und Ausziehen des Rückstandes mit absolutem Alkohol in

[12]) Ann. chim. phys. [3] 56, 54.

fast reinem Zustande herstellen liess. Der nach dem Verdunsten des Lösungsmittels verbleibende, gelb gefärbte, dickflüssige Rückstand zeigte den brennend süssen Geschmack des Glycerins und die Reaktion desselben mit Phenol und concentrierter Schwefelsäure. Ich erhitzte die gelbe, syrupartige Masse mit dem gleichen Quantum Phenol und dem dritten Teil Schwefelsäure eine halbe Stunde im Paraffinbade auf 120—130° und erhielt eine dunkelrote Masse, welche in Wasser wenig mit bräunlich-gelber Farbe, in Alkalien hingegen leicht mit roter Farbe löslich war, eine Reaktion, welche nach Reichel[13]) ein sicheres Kennzeichen für das Vorhandensein von Glycerin ist. Um dies jedoch noch deutlicher zu bestätigen, benzoylierte ich den Rückstand nach der Baumannschen Methode in der von R. Diez[14]) angegebenen Weise. Ich vermischte 0,4 g der syrupartigen Masse mit 40 g Wasser und 10 cc Benzoylchlorid, schüttelte das Gemisch unter allmählicher Zufügung 10 prozentiger Natronlauge und Abkühlung so lange, bis der Geruch nach Benzoylchlorid verschwunden war, und sammelte das ausgeschiedene Estergemenge auf einem Filter. Dieses Produkt unterwarf ich der Elementaranalyse, wobei sich ähnliche Zahlen ergaben, wie sie Diez für das dabei gebildete Estergemenge erhalten hat.

Analysen:

I. 0,2212 g Substanz gaben 0,5635 g CO_2 und 0,1008 g H_2O.

II. 0,2103 g Substanz gaben 0,5637 g CO_2 und 0,0960 g H_2O.

Berechnet für:		Gefunden:	
$C_{17}H_{16}O_5$	$C_{24}H_{20}O_6$	I	II
C 68,00	71,29	69,43	69,13
H 5,33	4,95	5,06	5,04

Die Wachsarten lieferten mir in derselben Weise die entsprechenden Alkohole, und bei meinen Arbeiten über das Cholesterin resp. Isocholesterin erhielt ich durch Verseifung ihrer Benzoësäureester nach der Natriumalkoholatmethode ebenfalls die freien Cholesterine in ganz reinem Zustande.

Die Aufklärung des Verseifungsprozesses ist durch eine im März 1891 erschienene Arbeit von A. Kossel und M. Krüger („Über die Verseifung von Estern mit Natriumalkoholat“[15]) gefördert worden.

[13]) Ber. d. d. chem. Ges. 9, 1429.

[14]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 11, 472.

[15]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 15, 321.

Genannte Autoren brachten die Frage der Verseifung in Zusammenhang mit Versuchen, welche Claisen[16]) früher schon über die Bildung von intermediären Additionsprodukten zwischen Natriumalkoholaten und aromatischen Estern angestellt hat, wobei ein Austausch der Alkoholradikale stattfindet. Sie liessen Natriumalkoholat resp. Amylat auf den Salicylsäurephenylester (sog. Salol) einwirken und erhielten auch den Salicylsäureäthyl- resp. Amylester, Thatsachen, welche Claisens Annahme einer intermediären Bildung nachstehender Verbindungen stützen:

$$C_6H_4\,OH\,C\begin{cases}ONa\\OC_2H_5\\OC_6H_5\end{cases} \text{ und } C_6H_4\,OH\,C\begin{cases}ONa\\OC_5H_{11}\\OC_6H_5\end{cases}$$

Kossel und Krüger erhielten ferner aus dem Hammeltalg mittels Natriumäthylat und -amylat ein Gemenge der Äthyl- resp. Amylester der Palmitin- und Stearinsäure. Sie stellten den Versuch in der Art an, dass sie 33 g Hammeltalg in 150—200 cc Alkohol lösten, mit Natriumalkoholatlösung (enthaltend 3 g Natrium) versetzten und eine Viertelstunde auf dem Wasserbade erhitzten. Die ganze Flüssigkeit erstarrte beim Erkalten; zu der breiartigen Masse wurde viel Wasser gegossen, dann mit Äther versetzt und im Scheidetrichter so lange vorsichtig geschüttelt, bis sich zwei klare Schichten zeigten, alsdann der Äther abgetrennt und die wässerige Flüssigkeit aufs neue mit Äther extrahiert. Die ätherischen Lösungen wurden vereinigt und das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rest bestand aus einer Mischung von palmitinsaurem und stearinsaurem Äthyl. Sie erhielten aus den 33 g Hammeltalg 15 g Äthylester und ebenso 12,7 g Amylester. Bei der Verseifung waren gegen 260 cc Alkohol angewendet. Das von Claisen angenommene intermediäre Additionsprodukt, welches sich ebensowohl zwischen Fett und Natriumalkoholat hätte bilden müssen, wie zwischen Salicylsäurephenylester und Natriumalkoholat, und das dann unter Bildung von Glycerin und Fettsäureäthylester zerfiele, haben sie jedoch nicht zu isolieren vermocht, ebenso äussern die beiden Autoren sich nicht über den weitern Verlauf des Prozesses bis zur Bildung der Seife.

Mir scheint, dass hier zwei Möglichkeiten vorliegen, nämlich erstens, dass ein anfangs entstehendes Glycerinnatrium sich mit dem überschüssigen Alkohol zu Glycerin und Natriumäthylat umsetzt

[16]) Ber. d. d. chem. Ges. 20, 646.

und letzteres abermals auf den gebildeten Fettsäureester derart einwirkt, dass sich Natronseife und Äthyläther bildet. Die Unwahrscheinlichkeit einer derartigen Annahme liegt wohl auf der Hand, und es ist mir auch nicht gelungen, bei Wiederholung der Versuche von Kossel und Krüger ein Auftreten von Äthyläther nachzuweisen. Ich verseifte, da der Äthyläther seiner Leichtflüchtigkeit wegen sich der Beobachtung eher hätte entziehen können, Hammeltalg mit Natriumamylat unter Zusatz von Amylalkohol, um so den weit höher siedenden Amyläther zu erhalten. Jedoch auch hier war es nicht möglich, die Anwesenheit dieses Äthers zu constatieren. Es bleibt daher nach meiner Meinung nur übrig, dass man zur Erklärung des Prozesses den Wassergehalt der angewendeten Agentien mit in Betracht zieht.

Die beiden Autoren sprechen nur kurz von „absolutem Alkohol", worunter bekanntlich nicht allein der wirklich absolute, also 100procentige, sondern auch der Alkohol von 99.8 % und häufig nur 99,5—4 % Gehalt verstanden wird. Bei Anwendung solchen Alkohols scheint die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, dass diejenige Quantität Wasser sich in dem Reaktionsgemisch befindet, welche zur Zerlegung des Fettsäureesters notwendig ist, wobei man den ganzen Prozess als eine Verseifung durch Natronhydrat in alkoholischer (oder, nach der oben bei der Verseifung von Wollfett angegebenen Weise, in alkoholisch-ätherischer) Lösung ansehen könnte. Mit der Beantwortung dieser Frage habe ich mich nun eingehend beschäftigt und glaube durch Anstellung der folgenden Versuche zu einem endgültigen Resultat gelangt zu sein.

Wie oben erwähnt, konnten Kossel und Krüger durch Verseifung von Hammeltalg bei Anwendung von überschüssigem Alkohol den Palmitinsäure-Stearinsäure-Äthylester gewinnen; sie fanden, dass in verdünnten Lösungen eine grössere Ausbeute an Estergemisch zu erzielen ist, als in concentrierten, dass durch längere Einwirkung von Natriumalkoholat die Menge des Estergemisches abnimmt und dass nach zwölfstündiger Einwirkung sich kein Ester mehr vorfindet. Es liegt auf der Hand, dass der überschüssige Alkohol den Verseifungsprozess verlangsamt, schon durch das Vorhandensein von mehr Wasser, man hat Zeit, den Fettsäureäthylester zu isolieren; eine Esterbildung geht jedoch unter allen Umständen, sei es in verdünnten, sei es in concentrierten Lösungen, vor sich. Den Beweis hierfür liefert die Verseifung des Cocosnussfettes, welches vielleicht

am leichtesten und schnellsten zu verseifen ist; die Athylester der in ihm enthaltenen Fettsäuren liefern den angenehm nach gutem Wein riechenden Önanthäther; eine äusserst geringe Quantität ist bereits zu seiner Erkennung durch den Geruch hinreichend. Bei der Verseifung von Cocosnussfett mittels Natriumalkoholat in möglichst concentrierter Lösung konnte ich den Geruch nach Önanthäther sehr deutlich wahrnehmen.

Bemerkenswert sind nun folgende Resultate, welche ich betreffs der Geschwindigkeit der Verseifung bei Anwendung anderer gebräuchlicher Alkohole, wie Methyl- und Amylalkohol, erhielt. Unter gleichen Verhältnissen ausgeführt, verläuft die Verseifung mit Äthylalkoholat am schnellsten, in der Mitte steht diejenige mit Amylalkoholat, und am langsamsten geht sie mit Methylalkoholat.

Mit ganz entsprechender Geschwindigkeit verläuft eine Einwirkung des Glycerins auf die drei Alkoholate. Beim Vermischen desselben mit Äthylalkoholat entsteht sofort ein dicker Brei von Glycerinnatrium, bei Amylalkoholat in gleicher Concentration tritt der Niederschlag nach 10 Minuten allmählich wachsend, bei Methylalkoholat erst im Laufe eines Tages ein.

Das erste Stadium des Verseifungsprozesses ist wohl nach diesen Erfahrungen mit grosser Wahrscheinlichkeit als eine einfache Wechselzersetzung zwischen Alkoholat und Fett anzusehen, wobei die Unlöslichkeit des entstandenen Glycerinnatriums die eigentliche Ursache ist, weshalb der Prozess so schnell verläuft.

Fettsaures Glycerin + Natriumalkoholat = Glycerinnatrium + Fettsäureäthylester.

Die Bildung von Glycerinnatrium ist vor sich gegangen, dagegen ein Vorhandensein von Äther nicht nachzuweisen, nachdem alles Fett vollständig verseift ist; es leuchtet demnach die gänzliche Unmöglichkeit ein, dass das Glycerinnatrium sich mit dem anwesenden Alkohol abermals zu Alkoholat und Glycerin zersetzt und so ein umgekehrter Verlauf der Reaktion eintritt, wie bei den oben erwähnten Versuchen. Dagegen wird Glycerinnatrium sehr leicht durch Wasser zu Glycerin und Natronhydrat zersetzt. Das Natronhydrat wird also den Prozess zu Ende führen, um so leichter, als es nur noch auf Fettsäureäthylester und nicht mehr auf Fett einzuwirken hat.

Die zur Verseifung von 1 g Fett erforderliche Quantität Wasser beträgt 0,06 g; betrachtet man die Versuche, welche Kossel und

Krüger in der Weise anstellten, dass sie 5 g Fett mit 50 cc Alkohol und 0,75 g Natrium (in 11,5 cc Alkohol gelöst), oder 5 g Fett mit 8,1 cc Natriumalkoholatlösung (0,42 g Natrium enthaltend) und 50 cc Alkohol zusammenbrachten und dabei eine Verseifung erzielten, und nimmt man weiter an, sie hätten 99,4—5procentigen Alkohol angewendet, so würde dieser die hinreichende Menge Wasser geliefert haben, die zur Bildung von Natronhydrat und einer hierdurch veranlassten Seifenbildung erforderlich wäre. Erwärmt man ausserdem in einem offenen Gefässe auf einem Wasserbade, wie es die beiden Autoren thaten, so nimmt der Alkohol mit Leichtigkeit Wasser auf, jedenfalls so viel, als zur Verseifung nötig ist; durch Aufsetzen eines Kühlers kann man daher auch (nach Angabe von Kossel und Krüger) eine vollständige Verseifung verhindern. Setzt man auf den Kühler noch ein Chlorcalciumrohr, so wird die Verseifung noch unvollständiger; es wird dadurch eben dem Alkohol die Möglichkeit genommen, Wasser aus der Luft anzuziehen.

Die Herstellung von absolutem Alkohol, seine Anwendung als solcher ist mit grosser Schwierigkeit verbunden; er nimmt begierig Wasser auf und enthält bald 0,3 bis 0,6 Volumprozent davon; ob ferner ein Alkohol 99,4 oder 99,5% Gehalt hat, ist ebenfalls nicht so einfach zu ermitteln. Ich stellte daher folgenden Versuch an, den ich ausführlich beschreiben möchte:

Den höchstprozentigen Alkohol, den ich bekommen konnte, liess ich 14 Tage über gebranntem Kalk stehen, dann destillierte ich ihn ab. Einen Liebigschen Kühler verband ich an einem Ende mit dem den Alkohol enthaltenden Rundkolben, am andern mit einer tubulierten Vorlage, in deren Tubus ein Chlorcalciumrohr luftdicht eingesetzt war. Alle Teile waren gut mit Korkstopfen verbunden, nur durch das Chlorcalciumrohr konnte Luft hinzutreten. Zunächst erwärmte ich nun den Rundkolben eine halbe Stunde und liess ihn wieder erkalten; alsdann gab ich in denselben rasch 80 cc von dem Alkohol, welcher 14 Tage über gebranntem Kalk gestanden hatte, und destillierte. Bei 78,3°, dem Siedepunkt des 100procentigen Alkohols, ging $^1/_3$ über, die übrigen $^2/_3$ bei höheren Temperaturen; bei 79,5° waren gegen 70 cc übergegangen. Nun liess ich wieder erkalten, nahm schnell den Rundkolben ab und setzte hierfür ein langes Chlorcalciumrohr ein, stellte den Kühler vertikal (tubulierte Vorlage nach unten), entfernte wieder das Chlorcalciumrohr und gab rasch durch den Kühler ca. 1,5 g Fett und 1 g Natrium hinzu.

Bei drei Versuchen, die ich in dieser Weise anstellte, blieben nach halbstündigem Kochen durchschnittlich 1,3 g Fett unverseift, längeres Kochen erwies sich als wirkungslos.

Bei der von A. Kossel und mir seinerzeit gemachten Veröffentlichung über die neue Verseifungsmethode[17]) ist nur von soviel Alkohol die Rede, als zur Bildung des Natriumalkoholats erforderlich ist; das übrige der Lösung ist Äther, in welchem das Fett enthalten ist. Der Verseifungsprozess geht auf diese Weise bei gewöhnlicher Temperatur vor sich, die Verseifung ist eine vollständige und durch Kochen kann hier ebenfalls eine Beschleunigung herbeigeführt werden, ja, bei gewissen Fetten, wie Cocosnussfett und Butter, ist er in wenigen Sekunden vollendet. Meine Versuche ergaben, dass sein Verlauf der gleiche ist, wie bei alleiniger Anwendung von Alkohol. Verreibt man einige Sekunden, nachdem die Verseifung des Cocosnussfettes stattgefunden hat, den Äther auf der Handfläche, so tritt ein starker Geruch nach Önanthäther auf, überhaupt riecht der ganze Äther nach demselben. Nimmt man sehr viel Äther, namentlich solchen, welcher ziemlich wasserhaltig ist, so wird hierdurch die Verseifung verlangsamt, und man kann die Fettsäureäthylester leicht erhalten. Auf diese Weise stellte ich den Önanthäther direkt aus dem Cocosnussfett her.

Eine Verseifung kommt, wenn auch erst nach einiger Zeit, selbst dann zu Stande, wenn man in die feuchte ätherische Lösung ein blankes Stück metallisches Natrium giebt. Ist der Äther dagegen wasserfrei, und verschliesst man das Gefäss, in welchem sich die ätherische Fettlösung befindet, so erfolgt keine Ausscheidung von Seife; im ersten Fall wirkt also lediglich die Natronlauge, welche sich aus dem metallischen Natrium und dem im Äther enthaltenen Wasser bildet.

In wie weit die Methode mit Natriumalkoholat und Äther geeignet erscheint, die Verseifung als eine durch den Wassergehalt der vorhandenen Agentien verursachte zu erklären, mögen noch folgende Versuche zeigen.

Ich liess den für Laboratoriumszwecke gebrauchten Äther einige Tage über Chlorcalcium stehen und destillierte ihn über Natrium ab. In einem Rundkolben wurde 1 g Fett in 20 cc dieses Äthers gelöst und in der üblichen Weise Natriumalkoholat hinzugegeben. Trotz-

[17]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 14, 599.

dem dass das Reaktionsgemisch mehrere Stunden geschüttelt wurde, trat keine vollständige Verseifung ein, erst nach Zusatz von weiteren 40 cc des Äthers wurde der Prozess beendigt. Ist nicht genügend Äther vorhanden, und setzt man zu der ätherischen Fettlösung das Natriumalkoholat, so entsteht sofort ein dünnflüssiger Brei einer rotbraunen Masse; setzt man Wasser hinzu, so wird das Ganze zu einer hellbraunen trüben Flüssigkeit, aus welcher durch vorsichtiges Schütteln mit Äther das unverseifte Fett, welches eben jene Trübung hervorbringt, erhalten werden kann.

Ich möchte nicht unterlassen, für die praktische Ausführung der Verseifung noch folgende Beobachtung mitzuteilen. Es ist mir einigemal vorgekommen, dass das Fett vollständig zerstört wurde, weil ich das Natriumalkoholat sehr rasch, d. h. in der ganzen zu verwendenden Menge auf einmal und jedenfalls zu warm einwirken liess. Ich erhielt dann anstatt eines Seifenniederschlages eine chokoladenbraune Flüssigkeit.

Nach diesen Versuchen bin ich der Ansicht, dass es schliesslich das Wasser ist, welches den Verseifungsprozess zu Stande bringt. Der ganze Prozess teilt sich in zwei Stadien: zunächst erfolgt eine Bildung von Glycerinnatrium und Fettsäureäthylester. Letzterer ist leichter verseifbar als das Fettsäureglycerylester, auf ihn wirkt leicht im zweiten Stadium die Natronlauge ein, welche durch Zersetzung des im ersten Stadium gebildeten Glycerinnatriums durch vorhandenes Wasser entstanden ist.

In der Anwendung dieses Natriumalkoholatverfahrens auf feste und flüssige Fette habe ich nun ein Mittel zur quantitativen Bestimmung ihres Cholesteringehaltes gefunden.

III. Quantitative Bestimmung
des
Cholesterins in Fetten.

Die quantitative Bestimmung des Cholesterins, seine Trennung von den tierischen und pflanzlichen Fetten bildet seit langer Zeit den Gegenstand eingehender Untersuchungen. Es waren hauptsächlich Hoppe-Seyler und in neuerer Zeit Schulze, welche sich mit dieser Aufgabe beschäftigt haben. Ersterer zeigt uns in seinem „Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse (1883)“ eine quantitative Trennung des Cholesterins von den Fetten wie folgt:

„Die Fette werden zunächst in die Barytseifen übergeführt, welche man in Wasser zerteilt; aus den Barytseifen werden mittels Salzsäure die fetten Säuren abgeschieden und durch Schütteln mit Äther in diesen aufgenommen. Alsdann wird die abgegossene ätherische Lösung mit sehr verdünnter Natronlauge geschüttelt und nach dem Abheben der Atherschicht diese zur Entfernung der in den Äther übergehenden Mengen von Seifen nochmals mit Wasser ausgeschüttelt.“

Wenn diese Methode auch in der Hand geübter Forscher zu brauchbaren Resultaten führen mag, so stehen der allgemeinen Anwendung derselben doch einige Bedenken entgegen, welche ich nicht unerwähnt lassen möchte. Mit Schulze und Barbieri stimme ich darin überein, dass die mit obiger Methode erhaltenen Resultate nicht ganz genau werden und ohne Zweifel auch schwer untereinander zu vergleichen sind. Schüttelt man die verseifte Substanz mit Äther aus, so wird dadurch nicht allein das Cholesterin in denselben aufgenommen, sondern zu gleicher Zeit eine Quantität Seife, die immerhin nicht unwesentlich ist. Denn einerseits löst bereits der Äther allein eine immerhin beträchtliche Menge gewisser Seifen, namentlich der Oleate. Andererseits nimmt er genügende Mengen Wasser auf, um ein Lösungsmittel auch für die palmitin- und stearinsauren Salze zu werden, die ja allerdings in absolutem Äther so gut wie unlöslich sind. Zudem ist eine wässerige oder alkoholische Seifenlösung, wie sie uns bei diesem Verfahren vorliegt, im Stande,

beträchtliche Mengen von Cholesterin aufzunehmen; sehen wir ja doch, dass das Cholesterin sich in der Galle in Seifen gelöst vorfindet. Kurzum, es bietet dieses Verfahren immerhin einige Schwierigkeit, da sowohl Cholesterin wie Seifen in die wässerige wie in die ätherische Lösung gelangen. Ich habe auch durch direkten Versuch bewiesen, dass die syrupartige Seifenmasse, welche nach dem Abdunsten des Alkohols bei der von Hehner angegebenen Verseifungsmethode übrig bleibt, bei 100° im Stande ist, bereits nennenswerte Quantitäten Cholesterin zu lösen.

Endlich neigen gerade Seifenlösungen beim Schütteln mit Äther sehr zur Bildung von Emulsionen, deren Trennung selbst bei längerem Stehen nicht erfolgt. Selbst wenn es gelingt, die Emulgierung durch grosse Vorsicht zu vermeiden, erfolgt die Trennung der Schichten nicht derart, dass sich hierauf eine quantitative Bestimmung basieren liesse.

Wie schon oben angeführt, lässt sich nun das Hehnersche Verseifungsverfahren durch Anwendung von Äther, mit welchem man den grössten Teil der Seifen aus der alkoholischen Lösung niederschlägt, vorteilhaft modificieren, man hat dann nur nötig, die wenig Seife enthaltende ätherische Lösung ein- bis zweimal mit Wasser auszuschütteln, dessen Quantität nur eine sehr geringe zu sein braucht. Die Resultate, welche dadurch bei der Analyse sich ergeben, sind zwar erheblich besser, doch können sie auf Genauigkeit immerhin noch keinen Anspruch machen.

Ich stellte nun behufs Auffindung einer neuen Methode weitere Versuche in der Richtung der Hehnerschen Methode an und wählte als Objekte wieder künstliche Gemische von Fett und Cholesterin. Die erhaltene Natronseife mischte ich diesmal mit Sand, um sie auf diese Weise vollständiger zu trocknen, alsdann extrahierte ich das Gemisch im Soxhletapparate. Bei dem Trocknen machte ich jedoch die Beobachtung, dass die Seife mit dem Cholesterin sich zu mehreren Klumpen vereinigte und nicht zu einem gleichmässigen Pulver zerrieben werden konnte; aus diesem konnte das Cholesterin nur teilweise extrahiert werden. Nun führte ich die Natronseifen durch Behandlung ihrer wässerigen Lösung mit Chlorbaryum in die schwerlöslichen Barytseifen über oder behandelte zum gleichen Zwecke das cholesterinhaltige Fett im geschlossenen Rohre bei 100° mit in Methylalkohol gelöstem Baryumhydroxyd; auch diese Methoden lieferten keine genügenden Resultate. Die Barytseifen aus festen Fetten

zeigten eine Anzahl Klümpchen, die nicht zu pulverisieren waren; die Barytseifen aus flüssigen Fetten waren kaum zu zerreiben, was entschieden davon herrührt, dass die pflasterartige Natur des ölsauren Baryums durch die Anwesenheit des Cholesterins noch erhöht wird.

Der Verlauf der Verseifung mit Natriumalkoholat brachte mich nun auf den Gedanken, diese Methode für die quantitative Bestimmung des Cholesterins nutzbar zu machen. Nachdem ich festgestellt hatte, dass bei Anwendung von Natriumalkoholat zur Verseifung der Fette die Bildung eines Glycerinäthers nicht stattfindet, dass ferner die Verseifung eine vollständige ist und die Seife sich in einer Form ausscheidet, welche es gestattet, dieselbe leicht mit Äther auszuwaschen und durch Filtration zu entfernen, so war zu hoffen, dass auf diesem Wege sich leicht eine quantitative Trennung des Cholesterins von den Seifen bewirken lassen würde, um so mehr, als das Wasser, das bei dem Hehnerschen Verfahren die Seifen löst und so mittelbar die Verluste an Cholesterin verschuldet, hierbei vollkommen ausgeschlossen ist.

Die Versuche wurden in folgender Weise ausgeführt: Es wurde je 1 g sorgfältig bei 120° getrocknetes und filtriertes Fett mit einer genau abgewogenen Menge Cholesterin zusammen in Äther gelöst, und zu dieser Lösung eine Natriumalkoholatlösung hinzugefügt, die durch Auflösen von 0,15 g Natrium in einer möglichst geringen Menge von 99prozentigem Alkohol in der Wärme hergestellt war. Man bedarf zu dem letztern Zweck nur 1—1½ cc Alkohol, die Masse muss beim Erkalten schnell erstarren. Es ist dieses die beste Concentration der Alkoholatflüssigkeit. Beim Eingiessen in die ätherische Flüssigkeit verschwindet das Natriumalkoholat nach kurzem Schütteln und zugleich beginnt die energische Verseifung, die nach dreistündigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur beendet ist. Die zugesetzte Menge Äther muss so gross gewählt werden, dass die ausgeschiedenen Seifen beim Umschwenken des Kolbens, in welchem man den Prozess vornimmt, einen nicht zu dicken Brei bilden, da sonst leicht von dem Seifenbrei eingeschlossene Fettreste sich der Verseifung entziehen könnten. Es dürften im allgemeinen 80 cc ausreichen. Öfteres Umschwenken ist zu empfehlen, hauptsächlich aber bei ölsäurereichen Fetten, weil hier die Seife sich leicht in fadenziehenden Massen ausscheidet. Bei festen Fetten, wie Hammeltalg, Wollfett und Cacaobutter, auch beim Ricinusöl zeigt die Seife ein feinkörniges Aussehen. Nach dreistündigem Stehen bringt man die

Seife auf ein Filter, saugt schwach ab und wäscht, unter vorsichtigem Durchrühren mit einem Glasstab, mit wasserfreiem Äther gehörig aus. Die Seife muss sich alsdann klar in heissem Wasser lösen, eine Trübung deutet noch auf Anwesenheit von Cholesterin. Diese Operation geht bei richtigem Verfahren sehr schnell vor sich und erfordert höchstens noch 150 cc Äther, welche durch einfaches Abdestillieren in reinem Zustande wiederzugewinnen sind. — Hat man nun zum Auswaschen möglichst wasserfreien Äther genommen, so scheidet sich in den vereinigten Lösungen aufs neue eine kleine Quantität Seife aus, deren Lösung unter dem Einfluss der geringen Alkoholmenge aus dem Alkoholat vor sich gegangen sein dürfte. Man entfernt dieselbe durch Filtration, destilliert aus dem Filtrat den Äther auf dem Wasserbade ab, entfernt bei festen Fetten die noch zurückbleibende Menge Alkohol durch Aussaugen der Luft aus dem Kolben unter Eintauchen desselben in ein siedendes Wasserbad und trocknet schliesslich den Inhalt bei 110—120°. Bei flüssigen Fetten ist es besser, den Alkohol auf dem Wasserbade einfach langsam verdunsten zu lassen. Trocknet man den Rückstand zu scharf, so bildet er Klumpen, aus welchen mittels Äther das von diesen eingeschlossene Cholesterin nicht entfernt werden kann. Nun wird dieser Rückstand, der schon aus ziemlich reinem Cholesterin besteht, mit möglichst wenig absolutem Äther (höchstens 10 cc) übergossen, einige Stunden stehen gelassen und dann, wenn ein sichtbarer Rest ungelöst geblieben ist, von diesem durch Filtration getrennt. Das Filtrat liefert nach dem Abdunsten und kurzem Erhitzen auf 120° das Cholesterin in wägungsfähigem Zustande.

Die Resultate der Fundamentalversuche sind nun folgende:

Angewandt: 1 g Fett, 0,15 g Natrium, 1,5 cc Alkohol und 80—100 cc Äther.

Versuch	I.	Angew.	Cholesterin	0,1030	g,	erhalten	0,1044	g
„	II.	„	„	0,1049	„	„	0,1025	„
„	III.	„	„	0,0963	„	„	0,0982	„
„	IV.	„	„	0,0814	„	„	0,0829	„
„	V.	„	„	0,1237	„	„	0,1250	„
„	VI.	„	„	0,1310	„	„	0,1320	„
„	VII.	„	„	0,0762	„	„	0,0776	„
„	VIII.	„	„	0,0792	„	„	0,0819	„
„	IX.	„	„	0,0675	„	„	0,0692	„
„	X.	„	„	0,1206	„	„	0,1224	„

Blinde Versuche: 1 g Fett, 0,15 cc Natrium und 5 cc Alkohol

A. Rückstand 0,0014
B. „ 0,0012
} Mittel 0,0013 g.

Bringt man bei den erhaltenen Resultaten die Durchschnittszahl 0,0013, welche die beiden blinden Versuche lieferten, in Abzug, so erhält man Differenzen in der vierten Decimalstelle. Mit Ausnahme des zweiten und sechsten Versuchs zeigen die Resultate, dass kein Cholesterin verloren geht.

Nicht so günstig fielen die Resultate bei Anwendung von Olivenöl aus.

Angewandt wurde 1 g Öl, 0,25 g Na.

Blinde Versuche:

A. Rückstand 0,0058
B. „ 0,0052
} Mittel 0,0055 g.

Versuch	I.	Angew. Cholesterin	0,0837 g,	erhalten	0,0932 g
„	II.	„ „	0,1073 „	„	0,1138 „
„	III.	„ „	0,0927 „	„	0,1002 „
„	IV.	„ „	0,1035 „	„	0,1164 „

Diese Resultate zeigen einen erheblichen Unterschied von den oben angeführten, bei welchen Hammeltalg angewandt wurde. Die Fehlerquelle liegt sicher in der bemerklichen Löslichkeit des ölsauren Natrons in Äther, so dass sich hier schon Differenzen in der dritten Decimale zeigen, welche Fehler von ganzen Prozenten ergeben.

Wie weit nun auch die Überführung in die Barytseife verbessernd auf die Resultate einwirkt, zeigt nachstehender Versuch, welchen ich in der Art anstellte, dass ich den von der Seife abfiltrierten ätherischen Auszug zunächst bis zum letzten Ätherrest eindunstete, Alkohol hinzufügte und mit $Ba(OH)_2$ kochte. Durch Anwendung einer alkoholischen Barytlösung wird ein Zusammenbacken der Barytseifen vermieden. Versuch IV lieferte hierbei 0,1151 g Cholesterin, ebenfalls kein brauchbares Resultat.

Durch die obigen Versuche ist dargethan, dass wenigstens bei festen Fetten zufriedenstellende Resultate mittels dieser Methode erhalten werden.

Im Folgenden möchte ich nun eine Methode beschreiben, welche, mit der vorhergehenden combiniert, zu wesentlich bessern Resultaten führt, und welche für feste und für flüssige Fette zu gebrauchen ist.

Wislicenus und Moldenhauer[1]) zeigten zuerst, dass die Cholesterinmolekel zwei Atome Brom addiert. Bei der Darstellung der bromierten Ester des Cholesterins, welche oben beschrieben worden ist, habe ich aufs neue diese Bromaufnahme bestätigt gefunden. Bei meinen Untersuchungen über die Eigenschaften des Isocholesterins habe ich die beiden Körper bromiert, zunächst um den Schmelzpunkt der beiden bromhaltigen Körper zu ermitteln; zur Darstellung des Cholesterindibromürs verwandte ich etwa 10 g Cholesterin; die rasche und energische Aufnahme von Brom seitens des Cholesterins wurde mir hierbei aufs deutlichste sichtbar und veranlasste mich, den Versuch zu machen, diese Bromaufnahme zu einer quantitativen Bestimmung zu verwenden.

Ich mischte wieder 1 g Olivenöl mit einer genau abgewogenen Menge Cholesterin, verseifte nach demselben Verfahren wie oben, und löste den vom Äther hinterlassenen Rückstand in Schwefelkohlenstoff. Alsdann setzte ich so lange von einer titrierten Bromlösung in Schwefelkohlenstoff hinzu, bis eine ins Gelbliche stechende Färbung eintrat. Die Anwendung einer 2,97prozentigen Bromlösung ergab folgende Resultate:

	Angewandt:	Verbraucht:	Erhalten:
I.	0,0999 g Chol.	1,38 cc Br. = CS_2	0,0987 g Chol.
II.	0,0896 „ „	1,25 „ Lösung	0,0894 „ „
III.	0,1463 „ „	2,05 „ „	0,1467 „ „
IV.	0,1130 „ „	1,57 „ „	0,1123 „ „
V.	0,1835 „ „	2,57 „ „	0,1835 „ „
VI.	0,0672 „ „	0,95 „ „	0,0679 „ „
VII.	0,0612 „ „	0,85 „ „	0,0607 „ „
VIII.	0,0732 „ „	1,02 „ „	0,0727 „ „
IX.	0,1042 „ „	1,45 „ „	0,1036 „ „
X.	0,1543 „ „	2,15 „ „	0,1537 „ „

Ich hatte zuerst auch Versuche mit in Chloroform gelöstem Brom angestellt, doch bemerkte ich hierbei, dass nach kurzem Umschütteln eine Entfärbung unter Entwickelung von Bromwasserstoffdämpfen eintrat. Die Resultate waren sehr ungenau und zeigten auch bei gleichen Mengen von angewandtem Cholesterin erhebliche Differenzen.

Desgleichen fielen Versuche, das Gemisch von Fett und Chole-

[1]) Ann. Chem. Pharm. 146, 175.

sterin gleich in Schwefelkohlenstoff zu lösen und ohne weiteres mit Bromlösung in Schwefelkohlenstoff zu titrieren, schlecht aus. Man ist auch auf diese Weise einerseits genötigt, mehr Schwefelkohlenstoff anzuwenden, andererseits haben manche Fette, so ganz besonders die Thrane, die Eigenschaft, eine bromhaltige Schwefelkohlenstofflösung sofort zu entfärben.

Um wirklich brauchbare Resultate zu gewinnen, halte ich daher eine Verseifung für erforderlich; ein Verlust an Cholesterin ist, wie wir bereits gesehen haben, bei der Verseifung mit Natriumalkoholat nicht zu constatieren. Da nun das ölsaure Natron nicht ganz unlöslich in Schwefelkohlenstoff ist, wird es für die Schärfe der Reaktion geboten sein, mit möglichst geringen Quantitäten von Schwefelkohlenstoff zu arbeiten, denn die Beobachtung zeigt, dass nur gelöstes Natriumoleat Brom addiert und so die Beendigung der Reaktion verschleiert. Ausserdem tritt der Umschlag von Gelb in Rotgelb desto präciser ein, je concentrierter die Lösung ist. Ich wandte bei den obigen Versuchen 1,5 bis 2 cc Schwefelkohlenstoff zur Lösung des Rückstandes an.

Wie sich Brom andern cholesterinähnlichen Körpern gegenüber verhält, ist noch nicht bekannt, es würde interessant sein zu erfahren, wie es auf Phytosterin, Caulosterin, Ambrain einwirkt.

Wie jeder Erfolg nur schrittweise zu erreichen ist, so hat auch die vorliegende Arbeit sich nicht das Ziel gesteckt, die Constitution des Cholesterins aufzuklären. Der Verfasser hofft jedoch, dass es ihm gelungen ist, wenigstens einige Bausteine diesem Gebäude angefügt zu haben. Die genauen Analysen der neu dargestellten Verbindungen dürften wesentlich zur sicheren Kenntnis der Molekulargrösse des Cholesterins und Isocholesterins beitragen und sind andererseits durch das neue Verseifungsverfahren und die quantitative Bestimmungsmethode die Cholesterine wesentlich leichter und bequemer zugänglich geworden. Der Verfasser spricht den Wunsch und die Hoffnung aus, dass seine Arbeit spätern Forschern von Nutzen sein und sie dem Endziele, der gänzlichen Aufklärung dieser hochinteressanten Körperklasse, entgegenführen möge.

Vorliegende Arbeit wurde in der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts der Kgl. Friedrich-Wilhelms-Universität zu

Berlin in den Jahren 1888 bis 1891 ausgeführt. Die Aufklärung des Verseifungsprozesses sowie der Schluss der quantitativen Bestimmung des Cholesterins mit Brom wurden während der Frühlingsferien 1891 in Dr. C. Scheiblers Laboratorium (R. Fiebig) ausgeführt.

Anhang.

Die ausgesprochene Krystallisationsfähigkeit der Cholesterinverbindungen liessen dem Verfasser genauere Messungen lohnend erscheinen. Herr Privatdozent Dr. A. Fock hatte die Güte, dieselben auszuführen. Die Resultate erlaube ich mir hier folgen zu lassen.

Cholesterylbenzoat.

Krystallform: tetragonal.

Axenverhältnis: $a : c = 1 : 3{,}6265$.

Beobachtete Formen: $c = (001)\,0P$,

$p = (111)\,P$, $o = (112)\,\frac{1}{2}P$,

$v = (449)\,\frac{4}{9}P$ und $m = (110)\,\infty P$.

Die farblosen Krystalle sind entweder tafelförmig nach der Basis oder gleichen abgestumpften tetragonalen Pyramiden. Die grösseren Individuen, welche Dimensionen bis zu 3 mm aufweisen, zeigen meist den letztgenannten Habitus und besitzen mit Ausnahme der Basis, die stets glänzend erscheint, nur trübe und gerundete Flächen, so dass die Messung hier nur unsichere Resultate liefert. In der Regel beobachtet man an diesen grösseren Krystallen die primäre Pyramide p, und die Pyramide mit halber Vertikalaxe o, nebeneinander, jedoch niemals beide in gleicher Ausdehnung: bald herrscht die eine vor, während die andere fast ganz verschwindet, bald kann man das umgekehrte Verhältnis constatieren. Nicht selten erscheint auch an dem einen Ende der Hauptaxe nur die primäre Form, während am andern Ende nur diejenige mit halber Vertikalaxe auftritt, so dass man leicht zu der Vermutung gelangt, die Substanz sei hemimorph bezw. hemiedrisch.

Jede der beiden genannten Pyramiden p und o wird noch von einer sogenannten vicinalen Form begleitet, welche hauptsächlich die Krümmung der betreffenden Flächen bedingt. Die vicinale Form der Pyramide o $(112)\,\frac{1}{2}\,P$ besitzt das Zeichen $(449)\,\frac{4}{9}\,P$, dasjenige der zur primären Pyramide gehörigen Form konnte leider mit Sicherheit nicht ermittelt werden.

Neben den genannten vicinalen Formen, welche stets nur untergeordnet auftreten, wurde an einzelnen Individuen in minimaler Ausdehnung auch noch das primäre Prisma m aufgefunden.

Die kleineren Krystalle, welche regelmässig mehr oder weniger dick tafelförmig nach der Basis erscheinen, zeigen meist nur eine der angegebenen pyramidalen Formen, der Mehrzahl nach die primäre Pyramide p, bisweilen auch wohl an dem einen Ende der Hauptaxe die Pyramide p, am andern Ende dagegen diejenige mit halber Vertikalaxe o. Die vicinalen Formen wurden hier nur selten beobachtet und dementsprechend gaben die Flächen in manchen Fällen gute Spiegelbilder, so dass die nachstehend angegebenen zuverlässigen Winkelwerte erhalten werden konnten:

	beobachtet:	berechnet:
$c : p\,(001) : (111) =$	$78^0\,58'$	—
$p : p\,(111) : (\bar{1}\bar{1}1) =$	$88^0\ 0'$	$87^0\,54'$
$c : o\,(001) : (112) =$	$68^0\,33'$	$68^0\,42'$
$o : o\,(112) : (\bar{1}\bar{1}2) =$	$82^0\,30'$	$82^0\,25'$
$c : v\,(001) : (449) =$	ca. $66\frac{1}{2}^0$	$66^0\,19'$

Spaltbarkeit vollkommen nach der Basis c.

Eine Platte nach der Basis zeigte die normale Interferenzfigur der einaxigen Krystalle.

Monobromcholesterylbenzoat.

Krystallsystem: rhombisch.

Axenverhältnis: $a : b : c = 0{,}7764 : 1 : ?$

Beobachtete Formen: $m = (110) \infty P$.

Die grösseren Krystalle bilden meist dünne, farblose Prismen, von einer Länge bis zu 5 und 10 mm und einer Dicke bis zu $\frac{1}{3}$ mm. Bei einzelnen Individuen herrscht auch wohl eine der Prismenflächen vor, so dass sie mehr wie längliche, dünne Tafeln erscheinen, indessen übersteigt die Breite dieser Gebilde nicht 1 mm, während die Dicke stets unter $\frac{1}{3}$ mm bleibt.

Endflächen konnten an keinem der Krystalle aufgefunden werden, und die Bestimmung der geometrischen Constanten bleibt demgemäss eine unvollständige. Selbst die grössten und besten Individuen endigten stets in unregelmässigen Spitzen, und auch bei der mikroskopischen Untersuchung konnten keine scharfen Endbegrenzungen aufgefunden werden.

Die kleineren Individuen bilden seidenglänzende Nadeln, welche zum Teil verfilzt erscheinen und bisweilen scheinbar dünnen Blättchen gleichen. An diesen Gebilden konnte keinerlei Messung ausgeführt werden; der nachstehend angeführte Prismenwinkel wurde als Mittel von 6 Messungen an den grösseren Individuen erhalten:

Beobachtet

$$m : m = (110) : (\bar{1}\bar{1}0) = 75^0\,39'.$$

Spaltbarkeit nicht beobachtet.

Auslöschungsrichtung des Lichtes auf den Prismenflächen parallel den Kanten.

Ebene der optischen Axen = Basis.

Durch die Prismenflächen gesehen, tritt je eine Axe ganz am Rande des Gesichtsfeldes aus. Eine nähere Bestimmung der Austrittsrichtung der Axen liess sich aber wegen der Unvollkommenheit des Materials nicht durchführen, und es ist deshalb auch nicht ganz unmöglich, dass die Substanz monosymmetrisch ist, indem die Prismenflächen sich als Querflächen charakterisieren und die Krystalle ohne Ausnahme nach der Symmetrieaxe verlängert erscheinen.

Isocholesterylbenzoat.

Die Krystalle bilden meist kurze, seidenglänzende Nadeln, zum Teil auch dünne, längliche Blättchen. Die Nadeln sind in der Regel zu Büscheln vereinigt und zeigen nicht selten eine radialfaserige Struktur. Die dünnen Blättchen sind gleichfalls meist zu grösseren Aggregaten vereinigt, welche sich am besten als schuppige, unregelmässige Gebilde charakterisieren lassen. Die einzelnen Individuen zeigen unter dem Mikroskop seitlich scharfe, geradlinige Begrenzungen, welche sich an den Enden unregelmässig zusammenschliessen. Nur einzelne Blättchen liessen eine scharfe, zu den Seitenkanten senkrecht stehende Endbegrenzung erkennen, während die prismatischen, nadelförmigen, faserigen Gebilde stets in eine unregelmässige Spitze endigten.

Die sämtlichen Gebilde erwiesen sich als doppelbrechend und zeigten ohne Ausnahme eine Auslöschungsrichtung des Lichtes parallel den Seitenkanten. An der Einheitlichkeit der Substanz ist somit nicht zu zweifeln, zumal sich auch Übergänge zwischen den beiden charakteristischen Formen der Substanz vielfach bemerkbar machten. Ein Austritt von optischen Axen konnte an den dünnen Blättchen nicht beobachtet werden.

Phtalsäurecholesterylester.

Die Krystalle gehören wahrscheinlich dem monosymmetrischen Systeme an und sind ohne Ausnahme mehr oder minder dick tafelförmig nach der Symmetrieebene. Ausser der Symmetrieebene $(010) \infty \breve{P} \infty$ beobachtet man regelmässig ein Prisma $(110) \infty P$ und ein Klinodoma $(011) P \infty$. Der ebene Winkel, welcher von den Flächen dieser Formen auf der Symmetrieebene gebildet wird und den Winkel β darstellt, beträgt $72^1/_2{}^0$. Selten und untergeordnet erscheint eine hintere Hemipyramide $(\bar{1}11) + P$, deren Schnittlinie auf der Symmetrieebene mit den Prismenkanten einen Winkel von ca. 68^0 bildet.

Von den zugehörigen Querflächen wurde nur das Orthopinakoid $(100) \infty \breve{P} \infty$ beobachtet.

Die grösseren Individuen zeigen Dimensionen bis zu $^1/_5$ mm und besitzen gut spiegelnde Endflächen; dieselben sind indessen selten allseitig ausgebildet, sondern meist zu unregelmässigen Aggregaten verwachsen, so dass nur eine mikroskopische Untersuchung möglich war.

Auslöschungsrichtung des Lichtes auf der Symmetrieebene ca. 39^0 gegen die Prismenkanten geneigt.

Cholesterylsuccinat.

Das farblose Präparat besteht aus kleinen, glänzenden Nadeln, welche bis zu $1^1/_2$ mm lang, $^1/_{10}$ mm breit und $^1/_{30}$ mm dick sind. Dieselben gehören dem monosymmetrischen Systeme an und werden gebildet von dem Orthopinakoid $(100) \infty \breve{P} \infty$, dem Prisma $(110) \infty P$ und der Symmetrieebene $(010) \infty \breve{P} \infty$. Das Orthopinakoid herrscht in der Regel vor und gilt für gewöhnlich als Auflagerungsfläche. Bei einigen Individuen zeigte indessen die Symmetrieebene oder das Prisma die grössere Ausdehnung.

Auslöschungsrichtung des Lichtes auf dem Orthopinakoid parallel

den Kanten, auf der Symmetrieebene dagegen ca. 20° gegen die Kanten geneigt.

Als Endfläche erscheint bei denjenigen Krystallen, bei denen das Orthopinakoid vorherrscht — und das ist die grosse Mehrzahl — eine Querfläche; bei den wenigen Individuen, welche auf der Symmetrieebene auflagern, konnte eine schiefe Endbegrenzung nicht aufgefunden werden.

Dibromcholesterylsuccinat.

Das Präparat besteht dem äussern Ansehen nach aus äusserst dünnen, farblosen Blättchen oder Schuppen von unregelmässiger Begrenzung. Unter dem Mikroskop zeigen die meisten Individuen aber doch scharfe Ränder. Eine Randkante herrscht regelmässig vor und parallel dieser liegt die Auslöschungsrichtung des Lichtes. Ausserdem ist gewöhnlich noch eine zweite, kürzere Randkante vorhanden, welche indessen zu der ersteren verschiedene Neigung besitzt; es wurden Winkel von 38°, 45°, 54°, 64° und 71° beobachtet. Selten traten zwei von diesen kürzeren Kanten gleichzeitig auf, niemals aber zeigte sich eine symmetrische Anordnung derselben, so dass über die Zugehörigkeit der Substanz zu einem bestimmten Systeme nichts Sicheres ausgesagt werden kann, zumal auch charakteristische Interferenzfiguren nicht aufgefunden werden konnten.

Bromcholesterylpropionat.

Die besten Krystalle des Präparats bilden längliche, rechteckige Blättchen und sind bis zu 5 mm lang, $^3/_4$ mm breit und $^1/_4$ mm dick. Einzelne Individuen zeigen auch wohl rein prismatischen Habitus. Bei beiden Arten liegt die Auslöschungsrichtung des Lichtes senkrecht zu den Längskanten, und dementsprechend gehört die Substanz wahrscheinlich dem rhombischen System an. Völlig ausgeschlossen ist die Zugehörigkeit zu dem monosymmetrischen Systeme zwar nicht, aber die Krystalle müssten dann ausnahmslos nach der Symmetrieaxe verlängert sein.

Einige der länglichen Blättchen zeigten an den Enden eine beiderseitige Zuschärfung, die betreffenden Kanten waren gegen die Längskanten, wie die Messungen an drei Individuen ergaben, gleichmässig um 20° geneigt und müssen demnach von einem Doma herrühren.

Die grösseren Krystalle zeigten vielfach Einschlüsse von kleineren Individuen; auch unregelmässige Verwachsungen einer grösseren Anzahl von Krystallen fanden sich nicht selten.

Isocholesterylpropionat.

Die farblosen Krystalle gehören sehr wahrscheinlich dem monosymmetrischen Systeme an und gleichen ohne Ausnahme mehr oder weniger feinen, dünnen Blättchen, die eine Länge bezw. Breite bis zu $^3/_4$ mm erreichen. Nur wenige kleinere Individuen besitzen indessen eine allseitige scharfe Begrenzung. Bezeichnet man die Auflagerungsfläche als Symmetrieebene $(010) \infty \breve{P} \infty$, so werden die auftretenden Kanten gebildet von dem Orthopinakoid $(100) \infty \breve{P} \infty$, der Basis (001) o P und einem hinteren Hemidoma $(\bar{1}01) + \breve{P} \infty$. Die der Basis und dem Orthopinakoid entsprechenden Kanten bilden einen Winkel, welcher der Axenschiefe β gleich kommen würde und 77° misst. Der Winkel, welcher von der Kante des Hemidomas mit derjenigen des Orthopinakoids auf der Symmetrieebene gebildet wird, beträgt $51^1/_2{}^0$.

Die Auslöschungsrichtung des Lichtes auf der Symmetrieebene liegt angenähert parallel zu der Kante des Hemidomas; bei der Messung ergab sich jedoch eine constante Abweichung von 2° und zwar in der Richtung gegen die Vertikalaxe bezw. die Kante des Orthopinakoids.

Die Krystalle sind vielfach auch zu grösseren unregelmässigen Aggregaten verwachsen.

THESEN.

I.

Bei animalischer Nahrung ist der Genuss des Kochsalzes entbehrlich.

II.

Die derzeitige chemische Nomenclatur erweist sich als unzureichend.

III.

Die electrolytische Darstellung des Aluminiums hat gegenüber der chemischen den Sieg davongetragen.

VITA.

Natus sum Kuno Obermüller Heidenheimensis die 17. mens. VI. a. h. s. LXI. patre Emilio, matre Emilia e gente Ramsperger. Patrem praematura morte abreptum adhuc vehementer lugeo. Fidei addictus sum evangelicae. Primordiis literarum imbutus sum in Gymnasio reali urbis Stuttgart. Qua schola X per annos frequentata, maturitatis testimonium adeptus, unum annum eadem in urbe militavi in legione „Kaiser Friedrich III“. Quibus peractis in academia Stuttgart studiis me dedi rerum montanarum, deinde studiis chemicis. Ibi VI per semestria versatus, analysibus et fabricationi rerum ferrariarum et encausticarum praefui in „Actiengesellschaft Eisenhüttenwerk Thale i. H.“ Dein Berolina in officina „Dr. Struve u. Soltmann“ analyses aquarum mineralium et praeparationem rerum chemico pharmaceuticarum perfeci. Post II annos in Universitate Berolinensi studiis me dedi chemicis et philosophicis per VIII sem. Docuerunt me hi viri illustrissimi Bach, Dieterich, v. Eck, v. Fehling (†), Gabriel, Hell, Jessen, Koch, du Bois-Reymond, v. Hofmann (†), Kossel, Liebermann, v. Marx, Schmidt, v. Schoder (†), v. Vischer (†), Will, v. Zech, Zeller.

Exercitationibus chemicis in laboratorio professorum v. Fehling (†), v. Marx (†), Kossel, Liebermann amplissimorum in arte chemica et physiologica virorum interfui.

Quibus omnibus, qui me summa humanitate ac liberalitate in studiis adjuvere, gratias habeo maximas semperque habebo.